

Cláudio José Cardoso Barbosa

**A Utilização da Saliva como Substrato de Diagnóstico e “Follow-up”  
do Carcinoma da Mama**

Universidade Fernando Pessoa – Faculdade das Ciências da Saúde

Porto, 2015



Cláudio José Cardoso Barbosa

**A Utilização da Saliva como Substrato de Diagnóstico e “Follow-up”  
do Carcinoma da Mama**

Universidade Fernando Pessoa – Faculdade das Ciências da Saúde

Porto, 2015

Cláudio José Cardoso Barbosa

**A Utilização da Saliva como Substrato de Diagnóstico e “Follow-up”  
do Carcinoma da Mama**

Tese de Mestrado apresentada à Universidade  
Fernando Pessoa como parte dos requisitos para  
obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária.

---

(Cláudio Barbosa)

## **RESUMO**

O uso da saliva como substrato capaz de traduzir informações sobre o estado de saúde, ou doença dos indivíduos, tem vindo progressivamente a suscitar interesse na comunidade científica. A saliva constitui uma alternativa ao sangue como fluido de diagnóstico apresentando vantagens evidentes.

A saliva total pode ser usada para o diagnóstico de doenças sistémicas, pois contém constituintes do soro que atingem a cavidade oral, através da circulação local das glândulas salivares, e também a partir do fluido crevicular. Dessa forma a saliva torna-se um substrato de diagnóstico de doenças hereditárias, autoimunes, malignas e infecciosas, bem como da monitorização de níveis terapêuticos de fármacos e uso de drogas.

Vários estudos demonstram a possibilidade de deteção inicial e follow-up do carcinoma da mama, com recurso a testes que se baseiam na deteção de marcadores específicos presentes na saliva, através de abordagens, englobando a proteómica, a transcriptómica e a metabolómica.

## **ABSTRACT**

The use of saliva as a substrate capable of translating information about the State of health or illness of individuals, has progressively raised interest in the scientific community. Saliva is an alternative to blood as diagnostic fluid presenting clear advantages.

The whole saliva can be used for the diagnosis of systemic disease because it contains serum constituents that reach the oral cavity through the local circulation of the salivary glands and also from crevicular fluid. In this way the saliva becomes a substrate of diagnosis of hereditary diseases, autoimmune, infectious, malignant and as well as the monitoring of therapeutic levels of drugs and drug use.

Several studies have shown the possibility of early detection and follow-up of breast carcinoma, using tests that are based on the detection of specific markers in saliva, through approaches encompassing the proteomics, transcriptomics and metabolomics.

## **DEDICATÓRIAS**

A todas as pessoas que diariamente lutam  
contra o carcinoma da mama.

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais por tudo.

Ao Professor Dr. José Frias Bulhosa, orientador deste trabalho, pela sua disponibilidade, apoio e dedicação.

Ao Dr. Luís Loureiro pela revisão de alguns termos e métodos científicos.

A todos os autores e editoras que deram permissão à utilização de figuras e tabelas neste trabalho.

## ÍNDICE GERAL

ÍNDICE DE FIGURAS .....	XI
ÍNDICE DE TABELAS .....	XIII
ÍNDICE DE SIGLAS .....	XIV
I) INTRODUÇÃO .....	1
II) DESENVOLVIMENTO .....	3
1) Métodos utilizados na pesquisa bibliográfica .....	3
2) Saliva.....	3
3) Carcinoma da mama .....	7
3.1) Fatores de risco .....	7
3.2) Tipos de carcinoma da mama .....	8
3.3) Diagnóstico .....	9
4) Diagnósticos salivares .....	9
5) Transferência de biomoléculas do sangue para a saliva .....	11
5.1) Difusão passiva.....	11
5.2) Transporte ativo .....	12
5.3) Ultrafiltração.....	12
6) Saliva versus sangue.....	13
7) Biomarcadores .....	15
7.1) Validação e qualificação .....	16
7.2) Descoberta de biomarcadores .....	17

7.2.1) Genómica e transcriciômica salivar .....	18
7.2.2) Proteômica salivar.....	20
8) Biomarcadores do carcinoma da mama.....	23
8.1) Biomarcadores salivares do carcinoma da mama .....	25
8.1.1) EGF; CEA e VEGF .....	26
8.1.2) CA 15-3 .....	28
8.1.3) C-erbB-2/ Her2/neu e CA 15-3.....	30
8.1.4) Proteomas e transcriptomas .....	33
8.1.5) Metabolitos .....	34
8.1.6) Calicreína.....	35
9) Recolha salivar .....	35
10) Perspetivas Futuras .....	37
III) DISCUSSÃO.....	41
IV) CONCLUSÃO.....	44
V) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	45
VI) ANEXOS.....	53

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1- Localização das glândulas salivares e inervação secretomotora (parassimpática). Fonte: (Drake, Vogl e Mitchell, 2010). Reproduzido com permissão de Elsevier. Richard L. Drake; A. Wayne Vogl; Adam W. M. Mitchell. (2010). GRAY'S Anatomia para Estudantes. Capítulo 8, Cabeça e Pescoço. 2ª Edição. (Anexo 1) .....	4
Figura 2- Transporte de biomoléculas do sangue para os ductos das glandulas salivares. a: transporte ativo; b: difusão passiva; c: ultrafiltração; d: células acinares (bomba de iões sódio (Na <sup>+</sup> ) para o ducto), seguido por água; e: células do ducto (bomba de Na <sup>+</sup> de volta para o sangue), produzindo saliva hipotónica; f: membrana celular, g: poro da membrana celular; h: espaço intracelular; i: célula acinar. Fonte: (Wong, 2006) Reproduzido com permissão de Elsevier (Anexo 2).....	12
Figura 3- Abundância de biomarcadores na saliva comparativamente com o sangue de 45 pacientes. Concentrações de biomarcadores são geralmente mais elevados em saliva não estimulada do que em saliva estimulada. A razão entre o valor médio em saliva não estimulada/saliva estimulada é indicada entre parentesis. Fonte: (Miller et al., 2010) Reproduzido com permissão de Future Medicine Ltd (Anexo 3) .....	14
Figura 4- Marcos históricos no desenvolvimento dos diagnósticos salivares. Fonte: (Cova et al., 2015) Reproduzido com permissão de Springer (Anexo 4). .....	17
Figura 5- Diagnóstico salivar do cancro oral usando tecnologia transcriptómica. Com uma probabilidade de corte de 50%, o autor alcançou uma sensibilidade de 91% e uma especificidade de 91%. A área calculada sob a curva de ROC foi de 0,95. Fonte: (Wong, 2006) Reproduzido com permissão de Elsevier (Anexo 2).....	20
Figura 6- Metodologia proteómica aplicada à proteína salivar. Fonte: (Amado et al., 2007) Reproduzido com permissão de Springer (Anexo 5).....	23
Figura 7- Curva de ROC para valores de VEGF e EGF salivares em amostras de indivíduos controlo e pacientes com carcinoma da mama. Área sob a curva de ROC, 84%. Fonte: (Brooks et al., 2008) Reproduzido com permissão de Spandidos Publications..	28

Figura 8- Relação entre a concentração sérica e salivar do CA15-3. Fonte: (Agha-Hosseini, Mirzaii-Dizgah e Rahimi, 2009) Reproduzido com permissão do autor Prof. Farzaneh Agha-Hosseini.....	29
Figura 9- Valores médios salivares e séricos de c-erbB-2 para os três grupos de mulheres. Fonte: (Streckfus et al., 2000b) Reproduzido com permissão de American Association for Cancer Research (Anexo 6).....	31
Figura 10- Exemplo de acompanhamento pós-operatório. O gráfico superior representa as concentrações salivares e séricas de c-erbB-2 ao longo do tempo de tratamento. O gráfico inferior representa as concentrações salivares e séricas de CA 15-3 ao longo do tempo de tratamento. Fonte: (Bigler et al., 2002) Reproduzido com permissão de John Wiley and Sons (Anexo 7).....	32
Figura 11 - Combinação de nove biomarcadores validados com uma sensibilidade de 83% (25 de 30 pacientes com carcinoma), com apenas uma taxa de falso-positivo de 3% (2 dos 63 indivíduos do grupo controle). O “BS+” e o “BS-” referem-se aos testes de biomarcador salivar positivo ou negativo respetivamente; o “VPN” e o “VPP” ao valor preditivo negativo e ao valor preditivo positivo respetivamente; o “Sens”, à sensibilidade; e a “Espe”, à especificidade. Baseado em: (Zhang et al., 2010). .....	33
Figura 12- Análise da curva ROC para a capacidade dos metabolitos salivares discriminarem amostras entre sujeitos saudáveis e pacientes com carcinoma da mama (n = 30). AUC= 0,973. Precisão dos modelos, com uma validação cruzada de 0,881. Fonte: (Sugimoto et al., 2010) Reproduzido com permissão de Springer (Anexo 8).....	34
Figura 13- Exemplo de “Lab-on-a-Chip”. A- LabNow; B-Nano-Biochip. Fonte: (Miller et al., 2010) Reproduzido com permissão de Future Medicine Ltd (Anexo 3).....	39

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1- Funções da saliva. Adaptado de: (Kaufman e Lamster, 2002).....	6
Tabela 2- Valores médios de proteínas para indivíduos de controlo saudáveis, para indivíduos com lesões benignas da mama e para indivíduos com carcinoma da mama. Baseado em: (Streckfus et al., 2000a) .....	26
Tabela 3- Níveis de proteínas salivares. Fonte: (Brooks et al., 2008) Reproduzido com permissão de Spandidos Publications.....	27
Tabela 4- Biomarcadores salivares para o carcinoma da mama.....	43

## ÍNDICE DE SIGLAS

2DE- 2-Dimensional gel Electrophoresis

ASCO- Sociedade Americana de Oncologia Clínica

BRCA 1- Breast Cancer 1

BRCA 2- Breast Cancer 2

CA- Antígeno do Cancro

CEA- Antígeno Carcinoembrionário

CDI- Carcinoma Ductal invasivo

CDIS- Carcinoma Ductal *in situ*

CLI- Carcinoma Lobular invasivo

CLIS- Carcinoma Lobular *in situ*

c-erbB-2- Recetor tipo 2 do Fator de Crescimento Epidérmico Humano

CE-TOF-MS- Capillary Electrophoresis Time-Of-Flight Whith Mass Spectrometry

DNA- Ácido Desoxirribonucleico

EGF- Fator de Crescimento Epidérmico

EIA- Imunoensaio Enzimático

ELISA- Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

ER- Recetor de Estrogénio

ESI-MS /MS- Electrospray Ionization whith Mass Spectrometry

FDA- Food and Drug Administration

FISH- Fluorescence *in situ* Hybridization

HER2- Recetor tipo 2 do Fator de Crescimento Epidérmico Humano

IEF- Isoelectric focusing

IgA- Imunoglobulina A

IGF-I- Fator de Crescimento Semelhante à Insulina I

IGF-II- Fator de Crescimento Semelhante à Insulina II

IHQ- Imuno-Histoquímica

LC-MS- Liquid Chromatography-Mass Spectrometry

LDI- Laser Desorption Ionization

MALDI-TOF-MS/MS- Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight  
with Mass Spectrometry

miRNA- microRNA

mRNA- RNAmensageiro

MS- Mass Spectrometry

NGF- Fator de Crescimento do Nervos

NGS- Next-Generation Sequencing/ Sequenciamento de Nova Geração

NIDCR- National Institute of Dental and Craniofacial Research

OMS- Organização Mundial de Saúde

PAI-I- Inibidor do Ativador de Plasminogénio

PCR- Polymerase Chain Reaction/ Reacção em Cadeia da Polimerase

PgR- Recetor de Progesterona

PK-PD- (Pharmacokinetic/Pharmacodynamic)

PR- Recetor de Progesterona

RNA- Ácido Ribonucleico

RT-PCR- Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction

RT-qPCR- Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction

SELDI- Surface-Enhanced Laser Desorption/Ionization

SDS-PAGE- Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis

TGF- $\alpha$ - Fator de Crescimento Transformante-alfa

TGF- $\beta$ - Fator de Crescimento Transformante-beta

TOF- Time-Of-Flight

uPA- Ativador de Plasminogénio do tipo urocinase

## VEGF- Fator de Crescimento Vascular Endotelial

## I) INTRODUÇÃO

O carcinoma da mama é a neoplasia maligna mais comum entre as mulheres. Apesar dos avanços nos tratamentos, mais de 520 mil pessoas morrem por causa desta doença anualmente em todo o mundo. Na maioria são diagnosticados numa fase tardia ou avançada, resultando em alta mortalidade. A deteção precoce, combinada com tratamentos eficazes, é essencial para melhorar a taxa de sobrevivência de pacientes com carcinoma de mama. Um teste de rastreio do cancro desejável deve ser não-invasivo, altamente sensível, específico, e rápido. (Feng et al., 2015)

Atualmente, em Portugal, com uma população feminina de 5 milhões, surgem 4.500 novos casos de cancro da mama por ano, ou seja, 11 novos casos por dia, morrendo diariamente 4 mulheres com esta doença. (disponível em: <http://www.ligacontracancro.pt/gca/?id=42>)

Enquanto o exame físico e a mamografia (2 incidências) são utilizados para a deteção precoce do carcinoma da mama, eles também são de trabalho intensivo e exigem profissionais de saúde altamente treinados e experientes. Além disso, apesar dos esforços para fornecer um diagnóstico preciso, esses procedimentos de triagem podem produzir uma percentagem substancial de falsos positivos e resultados falsos negativos, especialmente em mulheres com tecido mamário parenquimatoso denso. (Agha-Hosseini, Mirzaii-Dizgah e Rahimi 2009)

Desta maneira os investigadores tentam progredir em técnicas de diagnóstico bem como no follow-up do carcinoma da mama recorrendo a testes salivares.

Nestes últimos 15 anos a saliva tem vindo a desencadear um grande interesse pela comunidade científica, dada a descoberta de perfis moleculares no seu conteúdo que refletem doenças sistémicas. Será o início de uma nova metodologia de diagnóstico não invasivo, que oferece variadas vantagens, facilitando a deteção precoce de doenças autoimunes, doenças cardiovasculares, endócrinas, infecciosas (virais/bacterianas), renais e neoplásicas, melhorando de certa forma a gestão clínica.

O presente trabalho tem como objetivo avaliar o uso da saliva como substrato de diagnóstico do carcinoma da mama, averiguar ainda a possibilidade de monitorização da doença, importância da saliva e suas aplicações futuras, com base em pesquisas bibliográficas.

Os múltiplos componentes salivares não protegem apenas a integridade dos tecidos orais, mas igualmente funcionam como biomarcadores de doenças e condições sistêmicas do indivíduo.

A saliva abriga um largo espectro de proteínas/ péptidos, ácidos nucleicos, eletrólitos e hormonas que se originam a partir de várias fontes locais e sistêmicas. (Pfaffe et al., 2011)

Este processo ocorre devido à presença de uma fina camada de células epiteliais que separam os ductos salivares da circulação sistémica, tornando possível que substâncias em circulação sejam transferidas para a saliva por meio de difusão passiva, transporte ativo e ultra-infiltração. (Wong, 2006)

Crianças, idosos, pacientes especiais e doentes (de países em desenvolvimento), que necessitem de fazer exames periodicamente, beneficiarão também com estas novas tecnologias. (Kaufman & Lamster, 2012)

## **II) DESENVOLVIMENTO**

### **1) Métodos utilizados na pesquisa bibliográfica**

Para a realização deste trabalho foram pesquisados artigos científicos recorrendo aos motores de busca: “MEDLINE/PubMed”, “Science Direct”, “b-on”, “Google Academic” “Researchgate” e “Scielo” usando os seguintes descritores: «Saliva OR Salivary glands»; «Breast cancer»; «Saliva AND Breast cancer»; «Salivary Biomarkers AND Breast cancer»; «Salivary Diagnostics»; «Saliva AND Proteomics»; «Saliva AND Transcriptomics»; «Personalized Medicine».

Não se limitou o tempo de pesquisa, mas deu-se relevância a referências publicadas nos últimos 10 anos, em língua inglesa e portuguesa.

Realizaram-se ainda pesquisas em livros editados por conceituados autores que reúnem uma variedade de artigos selecionados recentemente pelos mesmos, sendo eles: “Salivary Diagnostics” por David T. Wong; “Advances in Salivary Diagnostics” por Charles F. Streckfus; “Progress in Tumor Marker Research” por Lee I. Swenson. Ainda foram realizadas pesquisas noutros livros para partes introdutórias como carcinoma da mama, saliva, e glândulas salivares.

### **2) Saliva**

A saliva é uma secreção complexa, ligeiramente ácida (pH= 6,0-7,0). (Lee e Wong, 2009) Oriunda de três pares de glândulas salivares, as glândulas major (+/-90% do seu volume): parótida, submandibular e sublingual (Figura 1). A restante saliva provém de outras glândulas, consideradas anatomicamente menores, as glândulas minor (+/-10% do seu volume), que estão localizadas em várias regiões da mucosa oral, como lábios, língua, bochechas, palato, faringe, exceto nas gengivas e na região anterior do palato duro. (Patel e Barros, 2015; Lawrence, 2002)

## A Utilização da Saliva como Substrato de Diagnóstico e “Follow-up” do Carcinoma da Mama

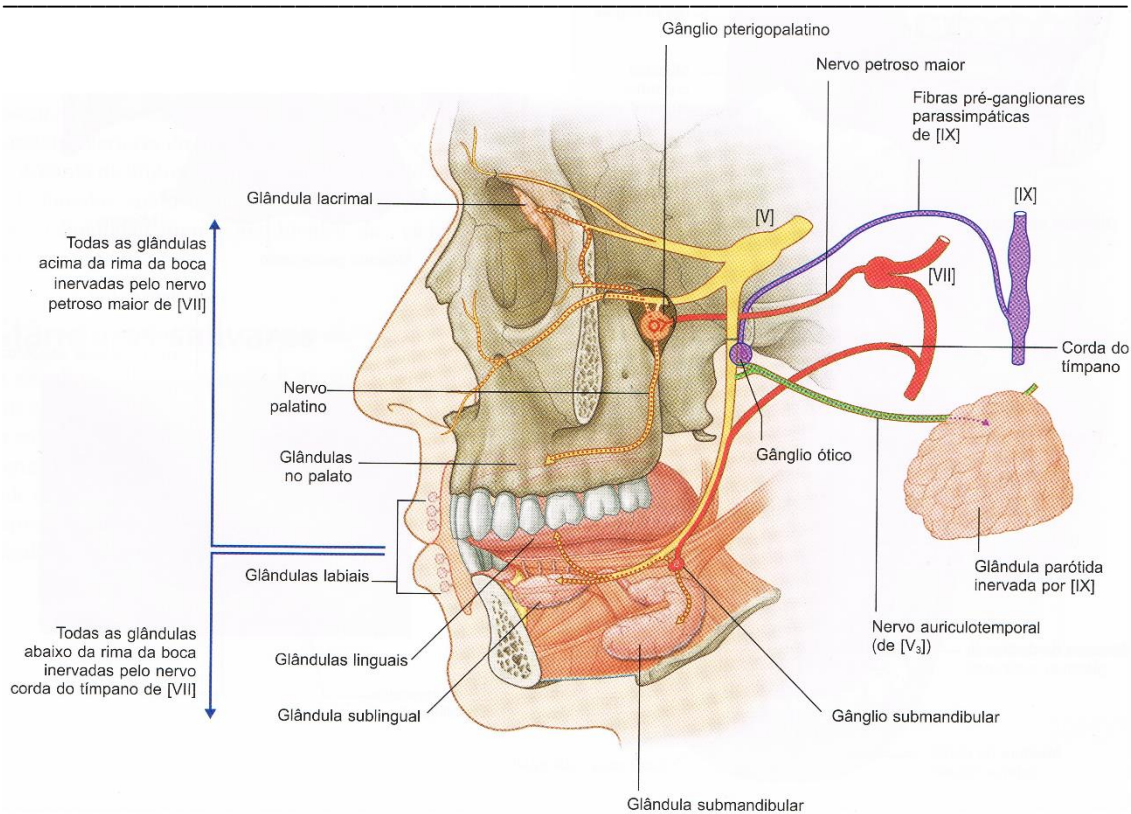


Figura 1- Localização das glândulas salivares e inervação secretomotora (parassimpática). Fonte: (Drake, Vogl e Mitchell, 2010). Reproduzido com permissão de Elsevier. Richard L. Drake; A. Wayne Vogl; Adam W. M. Mitchell. (2010). GRAY'S Anatomia para Estudantes. Capítulo 8, Cabeça e Pescoço. 2ª Edição. (Anexo 1).

A saliva é estéril quando sai das glândulas salivares, sendo designada por “saliva glandular específica”, é conduzida pelos ductos glandulares para a cavidade oral, onde entra em contacto com o fluido crevicular gengival, células sanguíneas, soro, células epiteliais descamadas, componentes celulares, bactérias e seus produtos, vírus, fungos, resíduos alimentares e secreções originadas nas vias aéreas superiores, perdendo o seu carácter estéril. Todos esses componentes formam a chamada saliva total ou integral. (Llena-Puy, 2006)

No geral, as glândulas salivares humanas produzem cerca de 1-1,5 litros de saliva mucosa e serosa por dia, combinando água, sais, uma grande quantidade de moléculas do sangue e um grupo de proteínas salivares, dando origem à multi-componente, a “saliva total”, sendo que 20% provém da parótida, 60% da submandibular e 7-8% da sublingual. (Lee e Wong, 2009; Patel e Barros, 2015)

A glândula salivar parótida é uma glândula acinosa composta, formada por ácinos serosos, envolvidos por células mioepiteliais, libertando as suas secreções em ductos intercalares. A glândula salivar submandibular é formada principalmente por ácinos serosos, contendo também uma pequena quantidade de ácinos mucosos, levando à produção de uma secreção mista. A glândula salivar sublingual é tubuloacinosa produzindo uma secreção mista, já que possui ácinos mucosos associados a ácinos serosos. (Gartner e Hiatt, 2010)

Em adultos, consideram-se os valores normais do total de saliva estimulada quando a sua secreção varia entre 1 e 3 mL/min, baixos quando varia de 0,7 a 1,0 mL/min, e hipossalivação quando é caracterizada por uma secreção de menos de 0,7 mL/min. O fluido salivar não estimulado normal varia entre 0,25-0,35 mL/min, baixo entre 0,1 e 0,25 mL/min, e a hipossalivação para menos do que 0,1 mL/min. (Almeida et al, 2008)

O fluido salivar é uma secreção exócrina, que consiste em cerca de 99% de água, abrangendo ainda uma variedade de eletrólitos como o sódio, o potássio, o cálcio, o cloreto, o magnésio, o bicarbonato e o fosfato (componentes inorgânicos). O grupo da componente orgânica engloba produtos de secreção corporal (ureia, ácido úrico e creatinina), produtos de putrefação (putrescina, cadaverina; lipídeos, como colesterol e ácidos gordos) e mais de 400 tipos de proteínas representadas por enzimas, imunoglobulinas e outros fatores antimicrobianos, glicoproteínas da mucosa, traços de albumina e alguns polipeptídeos e oligopeptídeos de importância para a saúde oral (Almeida et al., 2008; Lima et al., 2010)

As proteínas mais relevantes têm uma origem glandular ( $\alpha$ -amilase, histatinas, cistatinas, lactoferinas, lisozimas, mucinas e proteínas ricas em prolina), ou são derivadas do plasma sanguíneo (albumina, imunoglobulina A (IgA), transferrina) (Lima et al., 2010)

Existe uma forte relação entre funções da saliva e uma série de proteínas e outros constituintes, podendo cada componente participar em mais do que uma função, como representado na tabela 1. (Greabu et al., 2009)

<b>Funções</b>	<b>Componentes salivares envolvidos</b>
<b>Funções de proteção</b>	
<i>Lubrificação</i>	Mucinas, glicoproteínas ricas em prolina, água
<i>Antimicrobiana</i>	Amilase, complemento, defensinas, lisozima, lactoferrina, lactoperoxidase, mucinas, cistatinas, histatinas, glicoproteínas ricas em prolina, IgA secretora, inibidores da protease secretada por leucócitos, <i>statherin</i> , trombospondina
<i>Fatores de crescimento</i>	Fator de Crescimento Epidérmico (EGF), Fator de Crescimento Transformante-alfa (TGF- $\alpha$ ), Fator de Crescimento Transformante beta (TGF- $\beta$ ), Fator de Crescimento de Fibroblastos (FGF), Fator de Crescimento Semelhante à Insulina (IGF-I e IGF-II), Fator de Crescimento do Nervo (NGF)
<i>Integridade da mucosa</i>	Mucinas, eletrólitos, água
<i>Lavagem / limpeza</i>	Água
<i>Capacidade tampão</i>	Bicarbonato, iões fosfato, proteínas
<i>Remineralização</i>	Cálcio, fosfato, <i>statherin</i> , proteínas ricas em prolina aniônicos
<b>Alimentação e funções relacionadas à fala</b>	
<i>Preparo da comida</i>	Água, mucinas, glicoproteínas ricas em prolina
<i>Digestão</i>	Amilases, lipases, proteases, ribonuclease, água, mucinas
<i>Gosto</i>	Água, zinco
<i>Discurso</i>	Água, mucinas

Tabela 1- Funções da saliva. Adaptado de: (Kaufman e Lamster, 2002)

As proteínas ricas em prolina constituem uma parte substancial da proteína total salivar e têm importantes atividades biológicas. Em decorrência da concentração relativamente alta de radicais ácidos, especialmente grupos fosfato, essas proteínas apresentam grande afinidade pela hidroxiapatite, sendo um dos principais constituintes da película adquirida que recobre a superfície dos dentes, tendo também sido observados a nível do biofilme dentário. (Vitorino et al., 2004)

As mucinas constituem uma importante classe de glicoproteínas, sendo sintetizadas pelas células acinares mucosas das glândulas salivares que, na saliva total ou integral não

estimulada, representam cerca de 25% a 30% da concentração proteica total. (Amerongen et al., 2004)

A saliva é então composta por uma mistura complexa de produtos (orgânicos e inorgânicos) das glândulas salivares e outras substâncias que veem da orofaringe, vias aéreas superiores, refluxo gastro-intestinal, fluido crevicular gengival, depósitos de alimentos e componentes derivados de sangue. (Lima et al., 2010)

### **3) Carcinoma da mama**

As doenças da mama mais frequentes são de origem benigna, porém as alterações malignas podem ser muito parecidas às benignas, sendo necessária atenção por parte do clínico e do doente. (Santos e Lopes, 2014)

A transformação maligna é um processo complexo no qual intervêm fatores endógenos e exógenos. Cerca de 90% das neoplasias são consideradas como cancros esporádicos, onde alterações genéticas são adquiridas e ocorrem em células somáticas, já nos outros 10% as alterações dos genes ocorrem em células germinativas e têm uma transmissão hereditária, sendo portanto designados cancros hereditários. (Santos e Lopes, 2014)

#### **3.1) Fatores de risco**

Serão fatores de risco muito elevados os seguintes: mãe ou irmã com cancro da mama na pré-menopausa; antecedente de hiperplasia epitelial atípica ou neoplasia lobular *in situ* e suscetibilidade genética comprovada (mutação de BRCA1-2) e de risco médio: mãe ou irmã com cancro da mama na pós-menopausa; nuliparidade e antecedente de hiperplasia epitelial sem atipia. Menstruação antes dos 12 anos (menarca precoce); menopausa tardia ( $\geq 55$  anos); primeira gestação a termo depois dos 34 anos; obesidade; sedentarismo; terapia hormonal por mais de 5 anos e ingestão alcoólica excessiva são também considerados importantes fatores de risco. (Morgan, Gladson e Rau, 1998; Hoskins, Haber e Budin, 2001)

A densidade mamária elevada após os 45 anos e a exposição a fortes radiações também podem estar associadas a um risco elevado de cancro da mama. (Santos e Lopes, 2014)

A amamentação, bem como a prática de atividade física, são fatores protetores para o cancro da mama, tanto na pré- quanto na pós-menopausa. (Inumaru et al., 2011)

### **3.2) Tipos de carcinoma da mama**

A OMS (Organização Mundial de Saúde) refere a existência de 20 tipos histológicos de cancro da mama, embora predomine o carcinoma ductal invasivo, seguindo-se o carcinoma lobular invasivo. (Santos e Lopes, 2014)

A maior parte dos tumores malignos da mama têm origem nos ductos ou nos lóbulos da mama, que são tecidos glandulares, podendo ser não-invasivos ou invasivos, normalmente designados por: carcinoma ductal *in situ* (CDIS); carcinoma lobular *in situ* (CLIS); carcinoma ductal invasivo (CDI) e carcinoma lobular invasivo (CLI). (Hoskins, Haber e Budin, 2001)

O CDIS é o tumor da mama não invasivo mais frequente, limitado aos ductos, muitas vezes chamado de uma condição pré-cancerígena, consistindo em células anormais podendo tornar-se invasivas. A mamografia é o melhor método para diagnosticar o cancro da mama nesta fase precoce, sendo que, praticamente todas as mulheres podem ser curadas. (Peacock, 2001)

O CLIS é classificado como um cancro da mama não invasivo, que começa nos lóbulos, mas não penetra nas suas paredes. Raramente a mamografia resulta nestes casos e mulheres com esta neoplasia têm um maior risco de desenvolver cancro da mama invasivo. (Peacock, 2001) (Hoskins, Haber e Budin, 2001)

O CDI é o cancro da mama mais frequente (perto de 80 % dos casos) que tem origem nos ductos e invade os tecidos vizinhos. Nesta fase pode propagar-se através dos vasos linfáticos ou dos vasos sanguíneos e assim atingir outros órgãos. (Hoskins, Haber e Budin, 2001)

O CLI tem origem nas unidades produtoras de leite (10-15% dos casos) e pode disseminar-se para outras partes do corpo. (Hoskins, Haber e Budin, 2001)

### **3.3) Diagnóstico**

O autoexame é fundamental para que a mulher fique a conhecer o seu próprio corpo pois, caso note alguma alteração (área endurecida, nódulo, área dolorosa, escorrência mamilar), esta deverá recorrer a um profissional de saúde treinado, submetendo-se a uma observação clínica e anamnese e posteriormente sujeita a outros exames. Apenas em 20% dos pacientes a sintomatologia está associada as neoplasias malignas. (Santos e Lopes, 2014)

Os exames imagiológicos mais utilizados na deteção do cancro da mama são a mamografia, a ecografia mamária e a ressonância magnética. A mamografia é sensível em mulheres com idade superior ou igual a 45 anos, embora haja necessidade de equipamentos específicos. A ecografia apresenta menor sensibilidade nas mamas adiposas e involutivas (pós-menopausa), é útil na avaliação da axila e lesões não palpáveis, permite a realização de citologia e biopsia com agulha de corte. A ressonância magnética tem como vantagem uma alta sensibilidade porém, só se manifesta tão alta em casos até aos 40 anos, para além de ser um exame caro. (Santos e Lopes, 2014)

O diagnóstico anátomo-patológico seja ele a biópsia ou a citologia aspirativa deve ser obtido antes que seja efetuada qualquer terapêutica.

### **4) Diagnósticos salivares**

O diagnóstico salivar recebeu um grande impulso em 2002 face ao financiamento de um programa do *National Institute of Dental and Craniofacial Research* (NIDCR). "Desenvolvimento e validação de tecnologias para diagnóstico com base em saliva", foi projetado para estabelecer grupos profissionais de pesquisa, com conhecimentos em nanotecnologia e microfluidos, e ainda cientistas para desenvolver plataformas portáteis de diagnóstico para a deteção rápida e análise de biomarcadores. (Malamud et al., 2011)

A saliva é considerada um “espelho do corpo”, uma reflexão, sendo a sua utilização na monitorização do estado de saúde de um indivíduo um objetivo altamente desejável para a promoção de saúde e para a investigação em cuidados de saúde. (Lee et al., 2009)

Lee et al., (2009) e Pfaffe et al., (2011) referem que só recentemente houve um crescente interesse pela saliva, que pode refletir praticamente todo o espectro de estado de saúde/doença do indivíduo. Este fluido reflete um espectro de estados que incluem substâncias naturais em tecidos e uma variedade de moléculas introduzidas no corpo para fins terapêuticos, estado emocional, influências metabólicas e nutricionais, manifestações neurológicas, perfil imunológico e *status* hormonal. (Wong, 2006)

Tal como o sangue, a saliva é um fluido corporal complexo, conhecido por conter uma vasta gama de componentes moleculares, incluindo enzimas, hormonas, anticorpos e fatores de crescimento. (Yoshizawa et al., 2013) Os componentes moleculares têm origem em várias proveniências sendo elas locais ou sistémicas, porém a sua interpretação tem sido dificultada por falta de compreensão das biomoléculas integradas na saliva e seu impacto na etiologia da doença, acompanhada com a falta de alta sensibilidade nos sistemas de deteção. (Pfaffe et al., 2011)

A deteção precoce da doença desempenha um papel crucial no sucesso da terapia, já que a gerência de uma doença, especialmente na fase inicial, pode reduzir drasticamente a gravidade do seu impacto na vida do paciente, ajudando a prevenir e/ou retardar complicações posteriores. (Lee et al., 2009)

Os diagnósticos salivares evoluíram para uma ciência aprimorada e servem agora como um subconjunto do maior campo de diagnósticos moleculares entretanto reconhecidos, envolvidos numa ampla variedade de áreas biomédicas. (Malamud et al., 2011)

Existe um modelo hierárquico para avaliação da eficácia de qualquer teste diagnóstico: 1º a analítica (precisão e exatidão); 2º o diagnóstico (sensibilidade e especificidade); 3º a eficácia do resultado para o paciente; 4º operacional (valor preditivo e eficiência); e 5º o custo/benefício, são portanto 5 fatores básicos a ter em consideração (Streckfus e Bigler, 2002)

Uma desvantagem de utilizar saliva como um fluido de diagnóstico tem sido a concepção de que os biomarcadores estão geralmente presentes em quantidades menores na saliva do que no sangue, porém com novas tecnologias, inovadoras e muito sensíveis, a situação

altera-se, entretanto a saliva tem sido utilizada de forma fiável para detetar HIV 1 e 2, e a hepatite viral A, B e C, sendo ainda utilizada para monitorização de uma variedade de drogas, incluindo marijuana, cocaína, álcool e cotinina. (Segal e Wong, 2008)

A medicina dentária pode avançar, no que diz respeito à atenção primária da saúde, com a integração de triagem para condições médicas, servindo para a vigilância ao doente. (Wong et al., 2012)

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

Grande parte dos compostos orgânicos presentes na saliva são produzidos nas glândulas salivares, porém existem outros compostos que passam para a saliva a partir do sangue, através de mecanismos intra e extracelulares. Difusão passiva de moléculas lipofídicas, transporte ativo através de proteínas de ligação e ultrafiltração, são meios pela qual ocorre a transferência. (Pfaffe et al., 2011)

A artéria carótida externa envolve as glândulas salivares, ramificando-se em artérias menores e arteríolas. Seguindo para os ductos excretores, tais arteríolas dividem-se em capilares rodeando as porções secretoras, conectando-se por seguinte com um sistema venoso portal, ocorrendo o suprimento arterial (Figura 2). A pressão aumenta durante a secreção salivar quando o endotélio destes capilares, arteriais e venosos, é fenestrado. (Patel e Barros., 2015)

### **5.1) Difusão passiva**

Esta é a via intracelular mais comum, embora o transporte ativo também tenha sido relatado. (Kaufman e Lamster, 2002) Moléculas de grande porte, ou que estão ligadas a transportadores grandes como é o caso da albumina, estão impedidas de usar esta via, já hormonas esteroides, que são de tamanho mais pequeno e na maior parte compostos por ácidos gordos, tendem a passar facilmente por difusão. (Pfaffe et al., 2011)

### 5.2) Transporte ativo

Ocorre através das células secretoras das glândulas, esta é por exemplo a via utilizada pela IgA secretora (IgAs). A secreção de IgAs é aumentada por estímulo nervoso das glândulas salivares, porém os mecanismos responsáveis pela aceleração do transporte ainda não estão esclarecidos. (Pfaffe et al., 2011)

### 5.3) Ultrafiltração

Esta é a via extracelular mais comum, que ocorre entre as células. (Kaufman e Lamster, 2002). A filtração surge através dos espaços entre as células ductais e os ácinos. Moléculas que não podem passar através da camada dupla de fosfolípidos das membranas celulares devido às suas cargas elétricas, pensa-se que utilizem principalmente esta via. (Pfaffe et al., 2011)

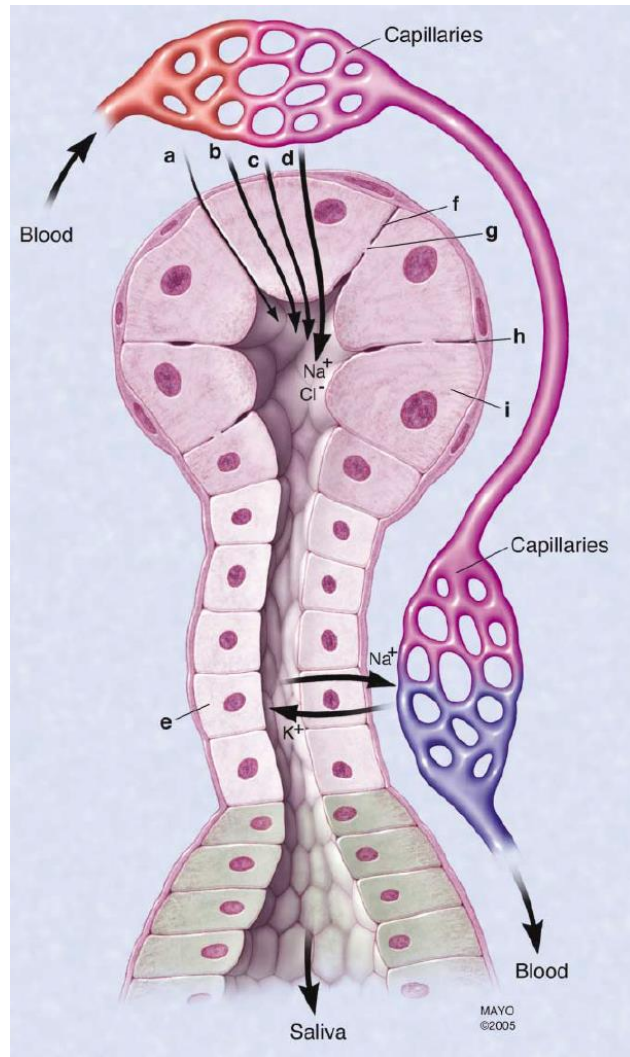


Figura 2- Transporte de biomoléculas do sangue para os ductos das glândulas salivares. a: transporte ativo; b: difusão passiva; c: ultrafiltração; d: células acinares (bomba de íons sódio (Na<sup>+</sup>) para o ducto), seguido por água; e: células do ducto (bomba de Na<sup>+</sup> de volta para o sangue), produzindo saliva hipotônica; f: membrana celular, g: poro da membrana celular; h: espaço intracelular; i: célula acinar. Fonte: (Wong, 2006) Reproduzido com permissão de Elsevier (Anexo 2).

## **6) Saliva versus sangue**

A saliva acarreta diversas vantagens sobre o sangue, sendo elas: a recolha é pouco exigente, já que a do sangue requer equipas altamente treinadas, entretanto a colheita salivar pode ser realizada por qualquer pessoa; é um procedimento não invasivo; a obtenção da amostra é indolor, o que reduz o desconforto à maioria dos indivíduos que padecem de biópsias e recolhas repetidas de sangue para análise; as amostras são mais fáceis de transportar e armazenar; a saliva ao contrário do soro não coagula e requer menos manipulação; é um procedimento mais económico, por ser facilmente obtida e transportada, o que resulta na diminuição de custos totais entre pacientes e até mesmo profissionais de saúde. (Yoshizawa et al., 2013)

O vírus da imunodeficiência humana (HIV) e muitos outros vírus, podem ser isolados na saliva, sendo portanto o risco de transmissão do HIV muito baixa, até mesmo através de práticas sexuais orais, o que, ao contrário de outras áreas do corpo, a cavidade oral parece ser uma via de transmissão diminuta para o HIV. Os níveis de RNA do HIV na saliva, a presença de um número de células CD4 + alvo, a presença de anticorpos IgA em saliva, a presença de outras infeções na cavidade oral, fatores endógenos, antivirais entre outros, são responsáveis pela redução do risco de contaminação. (Campo et al., 2006)

Quando o sangue contaminado é disseminado através de uma lesão, ou quando entra no corpo através de uma solução de continuidade na pele, existe um enorme potencial para a transmissão de doenças virais potencialmente fatais para todas as pessoas. (Quebbeman et al., 1991) Para avaliar o risco de contaminação, os investigadores seguiram um plano de avaliação que decorreu durante 234 operações, envolvendo 1.763 pessoas. Nesta investigação, em 50% dos atos clínicos, um profissional ficou contaminado com sangue. Cortes e outros ferimentos com seringas ocorreram em 15% das operações.

Sete biomarcadores, representados na figura 3, aparecem em concentrações mais elevadas na saliva do que no sangue, num estudo realizado com 45 pacientes saudáveis, porém a maioria dos marcadores são detetados em níveis mais baixos na saliva não estimulada do que no sangue. (Miller et al., 2010)

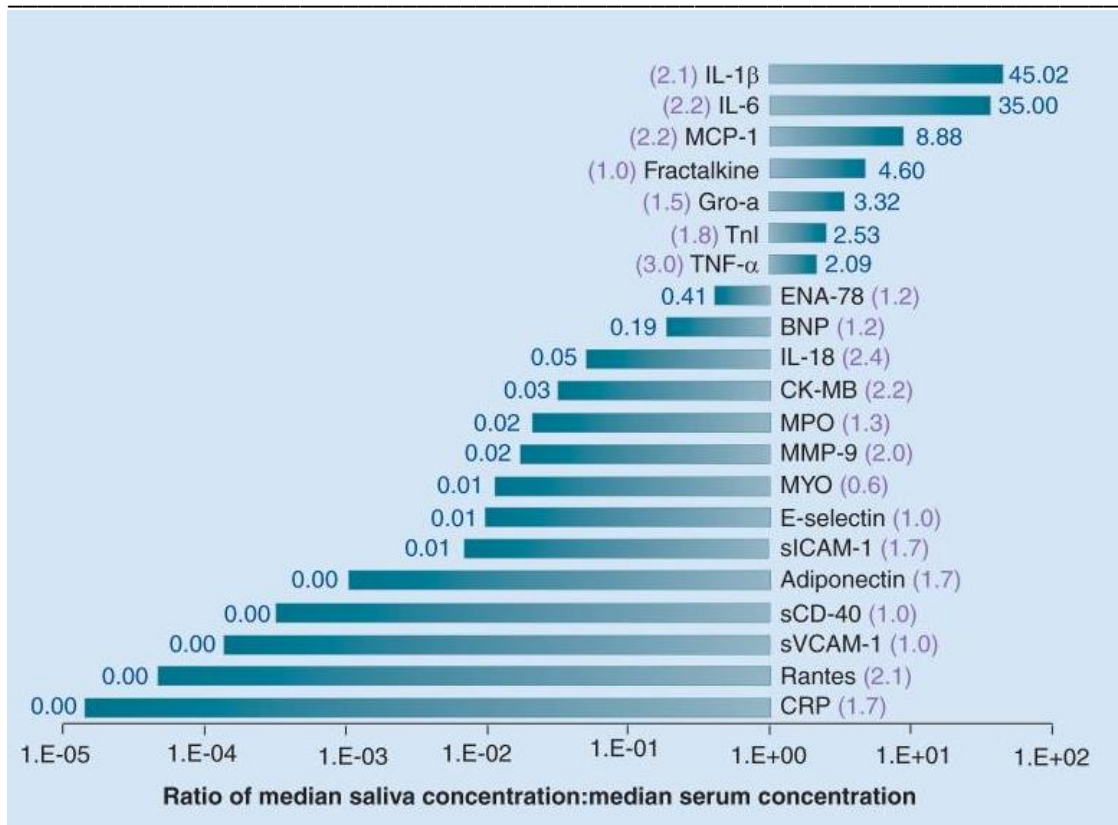


Figura 3- Abundância de biomarcadores na saliva comparativamente com o sangue de 45 pacientes. Concentrações de biomarcadores são geralmente mais elevados em saliva não estimulada do que em saliva estimulada. A razão entre o valor médio em saliva não estimulada/saliva estimulada é indicada entre parêntesis. Todas as amostras foram analisadas por imunoenaios enzimáticos convencionais. Fonte: (Miller et al., 2010) Reproduzido com permissão de Future Medicine Ltd (Anexo 3).

O sangue é a mais frequente fonte de biomarcadores mensuráveis, em muitos casos para salvar vidas, embora os procedimentos necessários para a colheita e análise de amostras de sangue, sejam muitas vezes caros, fisicamente intrusivos, podendo até mesmo causar alguma problemática. Assim, utilizando fluidos salivares como um meio para o desenvolvimento de biomarcadores e avaliação consequente, aliviará o desconforto do paciente através da contribuição de um método não invasivo de detecção da doença. (Yoshizawa et al., 2013)

Mesmo havendo avanços na investigação da proteômica salivar, proporcionando a oportunidade para identificar biomarcadores de doenças tanto locais como sistêmicas, a

redução de custos para o diagnóstico precoce da doença, o soro e a urina ainda são considerados como o fluido “padrão-ouro” para investigações. (Ogbureke e Ogbureke, 2015)

Em crianças, idosos, pacientes com necessidades especiais ou com distúrbios mentais a recolha torna-se mais facilitada, beneficiando com esta nova tecnologia. (Kaufman & Lamster, 2002) Mais precisa do que o sangue para a deteção de muitas doenças orais e sistêmicas, a saliva permite rastreios a grandes populações numa benéfica relação custo-benefício. (Greabu et al., 2009)

Este novo método de diagnóstico torna-se um método fulcral em pacientes cujas vias para recolha de amostras sanguíneas estejam comprometidas, ou de difícil acesso, como é o caso de indivíduos dependentes de drogas de administração intravenosa. (Veerman et al., 2008).

Para monitorização de drogas terapêuticas, a colheita de saliva ao invés de sangue tem muitas vantagens (Haeckel e Hänecke, 1996). Num estudo realizado por Gorodischer et al. (1994) relataram que 85% dos pais e 50% das crianças preferem recolha de amostras de saliva.

## **7) Biomarcadores**

*“...biomarcador é um termo coalescente que abrange o uso e desenvolvimento de ferramentas e tecnologias, monitorização e descoberta de drogas, desenvolvimento e compreensão de previsão, causas, progressão, regressão, resultado, diagnóstico e tratamento da doença.”* (Naylor, 2003) É uma característica devidamente medida e avaliada como futuro indicador de processos, sendo eles normais ou patológicos. (Mishra e Verma, 2010)

Um biomarcador pode ser secretado por uma molécula de um tumor, ou pode ser uma resposta específica do corpo à presença do cancro. (Mishra e Verma, 2010) Áreas como a genómica, a transcriptómica, a proteómica, e a metabolómica podem ser usadas para o diagnóstico de cancro, prognóstico e epidemiologia. Estas áreas, ainda em fase de estudo, têm servido de suporte clínico no que concerne às aplicações da saliva. (Wong, 2012)

Estes avanços têm possibilitado, através de técnicas de identificação e quantificação, a descoberta de biomarcadores, incluindo DNA salivar, RNA, proteínas e metabolitos. (Cova et al., 2015) Alterações na sua concentração, estrutura, função ou acção, podem estar associadas com o início, progressão, ou regressão de uma doença, ou com a resposta específica do corpo à patogénese. (Yoshizawa et al, 2013)

### **7.1) Validação e qualificação**

A FDA (*Food and Drug Administration*) tem um número de tomadas de posição, onde permanecem delineados padrões aceitáveis para a validação de biomarcadores e sua aceitação. Medidas para a qualificação do biomarcador são claramente confinadas por responsáveis. (Hunter et al., 2010)

A validação de um biomarcador sucede a avaliação do mesmo perante os seguintes parâmetros: sensibilidade do biomarcador; especificidade do biomarcador; avaliação do biomarcador em termos de exatidão, precisão, reprodutibilidade, gama de utilização, limite de deteção e variabilidade; probabilidade de falsos positivos; probabilidade de falsos negativos; e um PK-PD (farmacocinético / farmacodinâmico). (Hunter et al., 2010)

Para identificar biomarcadores como parâmetros de substituição requer-se a determinação de relevância e validade, sendo que a relevância se refere à capacidade de um biomarcador fornecer clinicamente informações relevantes sobre questões de interesse para o público, profissionais de saúde, ou ministérios da saúde, e a validade se refere à necessidade de caracterizar a eficácia ou a utilidade de um biomarcador como um autêntico substituto. (Strimbu e Travel, 2010)

A FDA continua a promover o uso de biomarcadores em pesquisa primária e clínica, bem como a investigação de novos biomarcadores essenciais para utilização como futuros testes (figura 4). (Strimbu e Travel, 2011)

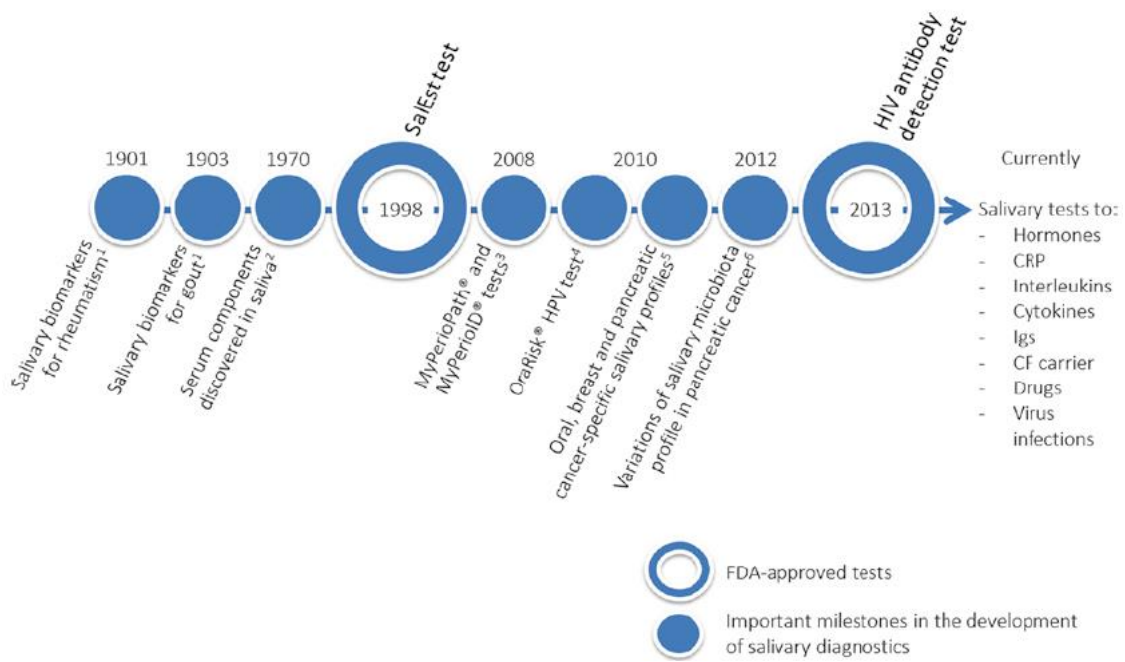


Figura 4- Marcos históricos no desenvolvimento dos diagnósticos salivares. Fonte: (Cova et al., 2015) Reproduzido com permissão de Springer (Anexo 4).

## 7.2) Descoberta de biomarcadores

O recente desenvolvimento de métodos de estabilização de temperatura ambiente, técnicas de pré-amplificação de ácidos nucleicos e análise do transcriptoma salivar, têm permitido a detecção e quantificação precisa de transcritos encontrados na saliva. Entretanto, novos métodos de estabilização de proteínas também têm facilitado as análises proteômicas, sendo que as análises de transcriptomas têm até agora alcançado o maior progresso em termos de sensibilidade e especificidade e em termos de implementação clínica. (Bonne e Wong, 2012)

Tanto a tecnologia proteômica como a transcriptômica salivar aumentaram o potencial de diagnóstico salivar. São tecnologias que levam a saliva como base de alto rendimento, automatizado, portátil, de baixo custo, mais eficiente e de mais rápida análise bioquímica. O desenvolvimento destas práticas ampliou os diagnósticos salivares da cavidade oral para todo o sistema fisiológico. (Rai et al., 2013)

De maneira a poder melhorar a prestação de cuidados de saúde, tem sido desenvolvida uma tecnologia de miniaturização, “*Lab-on-a-Chip*”, que é capaz de detetar

biomarcadores múltiplos em paralelo e que permite a avaliação simultânea de condições da doença. Deste modo, é possível reduzir as disparidades na área da saúde e melhorar o acesso aos cuidados médicos. (Lee e Wong, 2009)

Existe uma grande necessidade da utilização de ferramentas de diagnóstico adequadas e precisas para a “*Point-Of-Care*” (POC), sendo que se tornará importante, principalmente para países em desenvolvimento, onde pacientes continuam a receber tratamentos inadequados, devido a eventual erro no diagnóstico clínico. (Pfaffe et al., 2011)

### **7.2.1) Genómica e transcricção salivar**

A genómica salivar e a transcricção salivar surgem como sendo interessantes campos de investigação, uma vez que a saliva nos fornece uma conveniente pesquisa de DNA e de RNA. Estes dois ramos de pesquisa, juntos, com tecnologias de alto rendimento, como *microarrays* e *Next-Generation Sequencing* (NGS), possibilitam a deteção específica de estadios de doença. (Cova et al., 2015)

A *microarray* tem sido considerada como o *golden standard* para a identificação de transcrições, porém, devido à baixa concentração de alguns biomarcadores e ao pequeno volume de amostras, são exigidas mais inovações tecnológicas. (Bonne e Wong., 2012)

Em 2004, investigadores descobriram moléculas de RNA que são extraordinariamente estáveis em saliva, inclusive moléculas de mRNA que as células usam para a produção de proteínas. Esta descoberta foi apresentada como um “segundo alfabeto” no ramo do diagnóstico salivar. (Lee e Wong, 2009)

Os mRNAs fornecem *insights* sobre a transcrição de genes em estados normais e patológicos, tais biomarcadores são procurados por uma série de doenças como síndrome de Sjogren, cancro do pâncreas e do ovário, provando a sua sensibilidade, especificidade e precisão. Os miRNAs são curtas transcrições de RNA (19-25 nucleótidos), são caracterizados por desempenharem um importante papel no crescimento celular, na diferenciação, na apoptose, nas interações agente-hospedeiro, respostas de stress e função imunitária, são portanto biomarcadores de cancro muito poderosos. (Bonne e Wong., 2012)

Em recentes investigações foram identificadas mais de 3.000 espécies de mRNA e mais de 300 miRNA em saliva de indivíduos saudáveis e doentes, com isto ocorreu uma série de investigações que deram origem à identificação de biomarcadores salivares para o síndrome de Sjögren e vários tipos de cancro. (Yoshizawa et al., 2013)

O genoma salivar pode fornecer informações relevantes sobre a presença de agentes patogénicos e alterações nos perfis do gene. Na última década, provou-se que o DNA genómico extraído da saliva pode ser usado em ambiente clínico e de pesquisa, já que este é equivalente ao sangue no que diz respeito à sua quantidade e pureza. (Cova et al., 2015)

O DNA salivar foi investigado de modo a auxiliar profissionais de saúde no diagnóstico precoce de pacientes com história familiar de doenças, como a doença de Parkinson e outras, incluindo cancro e fibrose cística, sendo que um dos principais objetivos da genómica salivar é encontrar um gene ou uma mutação do gene, ou outro tipo de alteração implícita a uma doença específica. (Cova et al., 2015)

Tecnologia *microarray* e NGS são utilizadas para identificação dos biomarcadores genómicos e transcricionómicos. São então perfilados com estas tecnologias e validados com qPCR (Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa). (Bonne e Wong, 2012)

O primeiro passo na análise de RNA e DNA é a sua recolha seguida da extração dos mesmos e seu isolamento. Após o isolamento dos ácidos nucleicos, é importante avaliar a integridade e a qualidade da amostra, sendo que normalmente é realizada por RT (Transcrição Reversa), seguida da PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) ou PCR quantitativa (RT-PCR ou RT-qPCR). Este passo é também importante pelo facto de permitir a sua amplificação e assim possibilitar o incremento de estudos. (Cova et al., 2015)

*Microarray* seguida de análise de PCR quantitativa é bastante aceite para descoberta de biomarcadores. Normalmente os passos a seguir para a análise são os seguintes: 1º recolha da saliva; 2º isolamento isento de células, 3º preparação da amostra; 4º análise *microarray*; 5º processamento de dados; 6º análise de expressão genética pelo q-PCR; e 7º análise estatística. (Palanisamy e Wong, 2010)

Para demonstrar o potencial do transcriptoma salivar, um grupo da UCLA (Universidade da Califórnia, Los Angeles) analisou saliva de pacientes com cancro oral. Quatro genes (Interleucina-8, ornitina descarboxilase, espermidina acetiltransferase e Interleucina-1  $\beta$ ) foram capazes de distinguir e prever se uma amostra de saliva foi de um paciente com cancro ou de um indivíduo livre de patologias, com uma sensibilidade e especificidade de 91% cada (figura 5). (Wong, 2006)

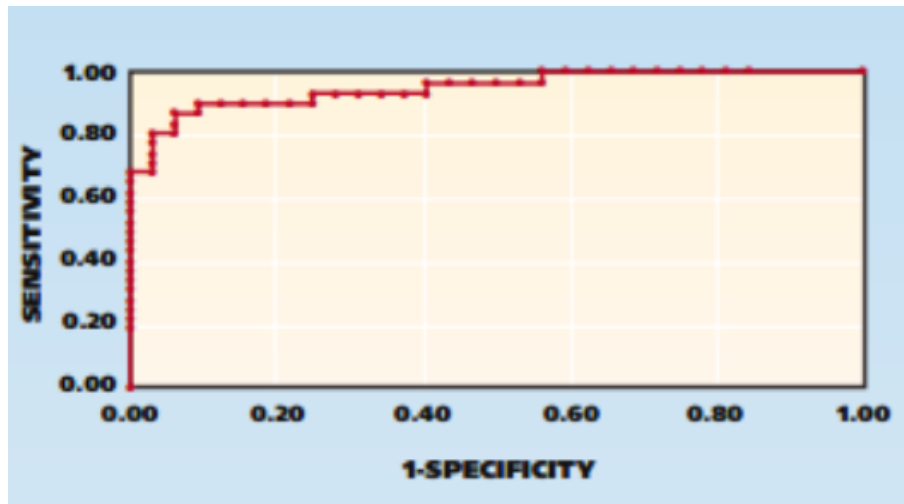


Figura 5- Diagnóstico salivar do cancro oral usando tecnologia transcriptómica. Com uma probabilidade de corte de 50 %, o autor alcançou uma sensibilidade de 91% e uma especificidade de 91%. A área calculada sob a curva de ROC foi de 0,95. Fonte: (Wong, 2006) Reproduzido com permissão de Elsevier (Anexo 2).

A transcriptómica tem crescido gradualmente e com ela a comercialização de produtos para a estabilização de RNA salivar e seu isolamento como RNAprotect® Saliva da QIAGEN e Oragen-RNA da DNA Genotek. (Segal e Wong, 2008)

### 7.2.2) Proteómica salivar

A proteómica tem permitido o crescente estudo da expressão proteica em diferentes tecidos e/ou fluidos corporais. O recente progresso de novas tecnologias e métodos nessa área têm aberto novas oportunidades para obtenção de informações sobre processos normais e anormais que ocorrem no organismo humano. A proteómica dedica-se então ao estudo do conjunto dessas moléculas, que são responsáveis direta ou indiretamente pelo controlo de todos ou quase todos os processos biológicos, estuda de forma descritiva

e quantitativa desde o conjunto de proteínas de um simples organelo celular até ao de um ecossistema, suas variações na população, mudanças em resposta a um ambiente ou decorrentes do desenvolvimento normal ou alterado, e modificações e interações com outras proteínas. (Barbosa et al., 2012)

O proteoma é o complemento de proteínas do genoma e a proteômica é a análise da porção do genoma que é expresso. Em fluidos corporais é muito valioso, devido ao seu elevado potencial clínico como fonte de marcadores de doença, e por isso a sua análise pode revelar condições de morbidade na fase inicial e monitorizar a progressão da doença. (Lee e Wong, 2009)

A saliva humana contém uma grande coleção de diversas proteínas, cada uma com funções biológicas distintas. Embora o seu conteúdo proteômico seja prezado em apenas 30% do sangue, a saliva está constantemente a ser investigada como uma fonte rica de proteínas como sendo biomarcadores. Para esse efeito, muitos estudos revelaram perfis de proteínas discriminatórios para o cancro oral, diabetes, doença periodontal, HIV, e carcinoma da mama. (Yoshizawa et al., 2013) Atualmente, a proteômica salivar é essencialmente caracterizada com mais de 3.000 proteínas diferentes já identificadas. (Cova et al., 2015)

O “*Saliva Proteome Knowledge Base*” (<http://www.skb.ucla.edu/cgi-bin/spkbcgi-bin/main.cgi>) foi o primeiro banco de dados no mundo a centralizar os dados da proteômica, anotando proteínas da saliva identificadas, sendo acessível ao público em geral. (Pfaffe et al., 2011)

Investigações na área da proteômica salivar humana assinalaram 4 principais tipos de proteínas salivares: proteínas ricas em prolina, *statherins*, cistatinas e histatinas. Estas proteínas desempenham um papel importante na manutenção de estruturas dentárias na cavidade oral e sua integridade, controlando de certo modo o equilíbrio entre a desmineralização e remineralização do esmalte do dente. (Pfaffe et al., 2011) Existem muitas outras proteínas presentes na saliva total, comuns a outros órgãos e biofluidos, como mucinas; lisozimas; lactoferrinas; aglutininas; peroxidases; anidrase carbônica; proteínas séricas como IgA salivar, IgG e albumina; proteínas da classe S100 e outras proteínas de ligação de cálcio; defensinas; e timosina  $\beta$  4. (Cova et al., 2015)

O primeiro passo na tecnologia de análise proteômica é obter o extrato, seguindo-se o seu isolamento. Depois ocorre a separação de proteínas por principais abordagens utilizadas, podendo ser divididas por 2DE (*2-Dimensional gel Electrophoresis*) ou, livre de gel, por LC-MS (*Liquid Chromatography–Mass Spectrometry*). (Xiau e Wong, 2011 e Pfaffe et al., 2011)

A 2DE é uma combinação de SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*), e IEF (*Isoelectric Focusing*). Esta combinação é capaz de separar e resolver as misturas complexas de proteínas, permitindo a identificação e a visualização de milhares de proteínas no mesmo gel. (Al-Tarawneh et al., 2011)

Após a etapa de separação, as proteínas são analisadas por *Mass Spectrometry* (MS), geralmente por MALDI-TOF-MS/MS (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight with Mass Spectrometry*), ou por ESI-MS /MS (*Electrospray Ionization with Mass Spectrometry*). (Cova et al., 2015)

A MS permite aos investigadores examinar um proteoma salivar em detalhes minuciosos. Com MS moderna pode-se detetar a presença ou ausência do nível de expressão, bem como modificações pós-translacionais de biomarcadores múltiplos num proteoma salivar alterados por doenças. (Al-Tarawneh et al., 2011)

MALDI é uma melhoria da técnica de LDI (*Laser Desorption Ionization*) e a principal vantagem com ionização por MALDI é a de uma elevada sensibilidade. É habitualmente usada com analisadores TOF (*Time-Of-Flight*), simples e sensíveis, e tem um grande alcance em massa, os espectros de massa tornam-se desta maneira simples de interpretar. (Al-Tarawneh e Bencharit, 2009) Uma variante do MALDI denominada SELDI (*Surface-Enhanced Laser Desorption/Ionization*) é geralmente empregue para a análise de proteomas de baixo peso molecular utilizando várias matrizes que exploram as características cromatográficas e biofísicas das diferentes proteínas. (Barbosa et al., 2012)

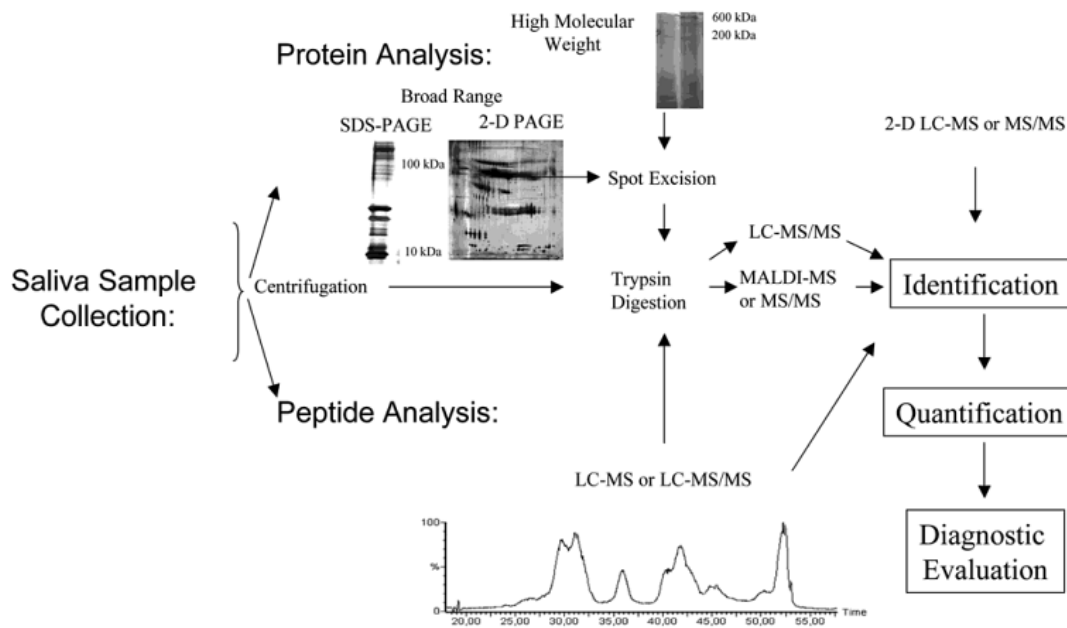


Figura 6- Metodologia proteômica aplicada à proteína salivar. Fonte: (Amado et al., 2007)  
Reproduzido com permissão de Springer (Anexo 5).

Numa última fase procede-se à validação funcional a partir de métodos como a ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) ou *Western Blot*. (Cova et al., 2015 e Al-Tarawneh et al., 2011)

A *Western Blot* possibilita a identificação de proteínas específicas através de uma mistura complexa de proteínas extraídas a partir de células. É uma técnica que ocorre em três fases distintas: 1º separação por dimensões, 2º a transferência para um suporte sólido, e 3º a marcação de proteínas alvo, utilizando um anticorpo primário e um secundário adequado para a visualização. (Mahmood e Yang, 2012)

## 8) Biomarcadores do carcinoma da mama

A Sociedade Americana de Oncologia Clínica (ASCO) recomendou oito diferentes marcadores tumorais relacionados à proteína do carcinoma da mama: CA 15-3, CA 27-29, Antígeno Carcinoembrionário (CEA), Recetor de Estrogênio (ER), Recetor de Progesterona (PgR), Recetor tipo 2 do Fator de Crescimento Epidérmico Humano (HER2), ativador de plasminogénio do tipo urocinase (uPA) e inibidor do ativador do plasminogénio (PAI -I). (Harris et al., 2007)

Os CA 15-3, CA 27-29 e CEA são biomarcadores recomendados para pacientes com doença metastática durante a terapia. É ainda recomendado o uso destes em conjugação com imagem, história e exame físico, para monitorização como resposta ao tratamento segundo a ASCO. (Harris et al., 2007) (Disponível em: <http://www.cancer.net/research-and-advocacy/asco-care-and-treatment-recommendations-patients/follow-care-breast-cancer>)

Os ER; PgR; e HER2 são recomendados pela sua utilidade na tomada de decisões sobre a terapia sistémica. Os ER e PgR devem ser medidos, no caso de carcinoma da mama invasivo primário e em lesões metastáticas, se os resultados influenciarem o plano de tratamento. A ASCO recomenda ainda que o HER2 seja avaliado em todos os câncros da mama invasivos primários, quer no momento de diagnóstico, quer no momento de recorrência. (Harris et al., 2007) (Disponível em: <https://am.asco.org/asco-creating-guidelines-management-metastatic-and-early-stage-invasive-breast-cancer>)

Os uPA e PAI-1 são recomendados para determinação do prognóstico em pacientes com diagnóstico recente. Os baixos níveis de ambos são associados a um baixo risco de recidiva. Estes estão entre os melhores marcadores de prognóstico até agora validados. (Harris et al., 2007) (Duffy et al., 2014)

Outros marcadores potenciais incluem p53, catepsina-D, ciclina E e calicreína14. (Harris et al., 2007)

Plataformas como “MapQuant Dx <sup>TM</sup>” da classe genómica, baseadas na expressão de cerca de 100 genes para deteção de cancro da mama, e sistemas de ensaio, “BCtect <sup>TM</sup>”, baseados em RT-PCR, com vários genes para a deteção, já estão disponíveis. Há também relatos sugerindo que um número de microRNAs (miRNA), incluindo mir-125b, mir-145, mir-21 e mir-155, podem ser considerados entre a lista de biomarcadores candidatos para o cancro de mama. (Ogbureke e Ogbureke, 2015)

Hipermetilação do BRCA1, p16 e 14-3-3  $\sigma$  presentes em cerca de 95% dos câncros da mama esporádicos e genes que codificam para a ciclina D2 e RAR- $\beta$ , representam biomarcadores epigenéticos. Outros candidatos e propostas de biomarcadores são:

citoqueratinas 8, 18 e 19; calicreína; osteopontina; p53 mutante; e crypto1. (Ogbureke e Ogbureke, 2015)

### **8.1) Biomarcadores salivares do carcinoma da mama**

Os primeiros estudos relacionando biomarcadores salivares com o carcinoma da mama compreenderam a utilização de proteínas, incluindo a proteína c-erbB-2 (Recetor tipo 2 do Fator de Crescimento Epidérmico Humano), um recetor tirosina quinase envolvido no crescimento celular; a proteína VEGF (Fator de Crescimento Vascular Endotelial), envolvida na vasculogénese e na angiogénese, a proteína EGF (Fator de Crescimento Epidérmico), que promove o crescimento, a diferenciação e a divisão celular; e a proteína CEA, um marcador tumoral envolvido na adesão celular. (Bonne e Wong, 2012)

Streckfus et al., (2000a) conduziram um estudo piloto para determinar se as proteínas relacionadas ao carcinoma da mama estariam realmente presentes na saliva. Para verificar a sua presença, este grupo de investigadores examinou um painel de marcadores de cancro na saliva de uma coorte de mulheres saudáveis, mulheres com lesões benignas da mama e mulheres com carcinoma da mama diagnosticado. Usando kits de ELISA (cada kit possuía um anticorpo monoclonal de captura), encontrou-se a presença dos seguintes marcadores tumorais: c-erbB-2; CA 15-3; catepsina-D; EGFR e p53, na saliva dos três grupos de mulheres (Tabela 2).

A Utilização da Saliva como Substrato de Diagnóstico e “Follow-up”  
do Carcinoma da Mama

Meio	Soro			Saliva		
	Carcinoma (n = 12)	Lesão Benigna (n = 8)	Saudável (n = 15)	Carcinoma (n = 12)	Lesão Benigna (n = 8)	Saudável (n = 15)
<i>erb</i> (U/mg proteína)	81.68±112 <sup>1</sup>	ND <sup>5</sup>	ND <sup>5</sup>	51.3±44 <sup>2</sup>	ND <sup>5</sup>	ND <sup>5</sup>
CA15-3 (U/mg proteína)	24.68±11 <sup>3</sup>	15.25±5	16.17±5	5.26±4 <sup>4</sup>	2.22±2	2.27±2
catepsina-D (pmol/mg proteína)	63.17±38	45.0±21	67.5±36	34.5±28	40.57±13	26.29±17
p53 (pmol/mg proteína)	8.9±8	14.63±9	14.2±8	134.6±64	180.7±71	177.1±61
EGFR (fmol/mg proteína)	5.63±3	3.52±2	8.5±8	0.92±1	0.37±0.3	1.03±0.69
Total proteína (mg/ml)	29.23±11	27.33±14	24.54±14	1.71±1	1.44±1	1.25±1

<sup>1</sup>*erb* saudável (soro) < *erb* carcinoma (soro) amostra t-teste (média vs. constante): t-valor = 14.31, p<0.0001.  
<sup>2</sup>*erb* saudável (saliva) < *erb* carcinoma (saliva) amostra t-teste (média vs. constante): t-valor = 14.31, p<0.0001.  
<sup>3</sup>CA15-3 saudável e lesão benigna (soro) < CA15-3 carcinoma (soro); ANOVA p<0.01.  
<sup>4</sup>CA15-3 saudável e lesão benigna (saliva) < CA15-3 carcinoma (saliva); ANOVA p<0.05.  
<sup>5</sup>ND- Não detetável.

Tabela 2- Valores médios de proteínas para indivíduos de controlo saudáveis, para indivíduos com lesões benignas da mama e para indivíduos com carcinoma da mama. Baseado em: (Streckfus et al., 2000a)

Os níveis de c-erbB-2 e de CA 15-3 em pacientes com a doença, foram significativamente maiores do que aqueles em controlo saudáveis e em pacientes com tumor benigno. Já os níveis de p53 foram mais elevados em indivíduos controlo, em comparação com os outros dois grupos. Embora a catepsina-D e o EGFR fossem detetados e em níveis elevados, em pacientes com carcinoma da mama, eles não demonstraram uma correlação clara com o *status* de doença. (Streckfus et al., 2000a)

### 8.1.1) EGF; CEA e VEGF

O fator de crescimento epidérmico (EGF) é conhecido por estimular as células do tumor, bem como regular o crescimento e a reparação do tecido. Esta proteína atua como um fator mitogénico potente que desempenha um papel importante no crescimento, proliferação e diferenciação de vários tipos de células. (Streckfus et al., 2007)

Navarro et al., (1997) mediram níveis de EGF na saliva de 74 pacientes com carcinoma da mama e em 33 mulheres saudáveis. O estudo demonstrou que as mulheres com cancro da mama tinham EGF salivar, aumentado quando comparadas com mulheres saudáveis.

Mais recentemente, Brooks et al., (2008) realizaram um estudo que pretendeu avaliar os níveis de proteínas salivares. Nesta investigação incluiu 49 indivíduos saudáveis e 49 com cancro de mama. Os níveis de VEGF, EGF e CEA na saliva foram medidos com testes de ELISA. Após a realização dos testes observou-se que os níveis de proteína em fluidos salivares foram significativamente elevados em pacientes com cancro. (Tabela 2)

*Teste de Wilcoxon para cada proteína salivar (mean ± SD) (ng/ml).*

	Controles saudáveis	Pacientes com cancro	p-value
<i>VEGF</i>	2.1±1.2	3.7±1.6	<0.0001
<i>EGF</i>	2.1±1.3	3.7±1.7	<0.0001
<i>CEA</i>	66.1±27.1	83.0±31.0	0.0106

Tabela 3- Níveis de proteínas salivares. Fonte: (Brooks et al., 2008) Reproduzido com permissão de Spandidos Publications.

As áreas sob a curva de ROC foram de 80%, 77% e 65%, respetivamente. Chegaram ainda à conclusão que a melhor previsão foi a partir da combinação de VEGF e EGF salivares com uma sensibilidade de 83%, especificidade de 74% e com AUC de 84% (Figura 7).

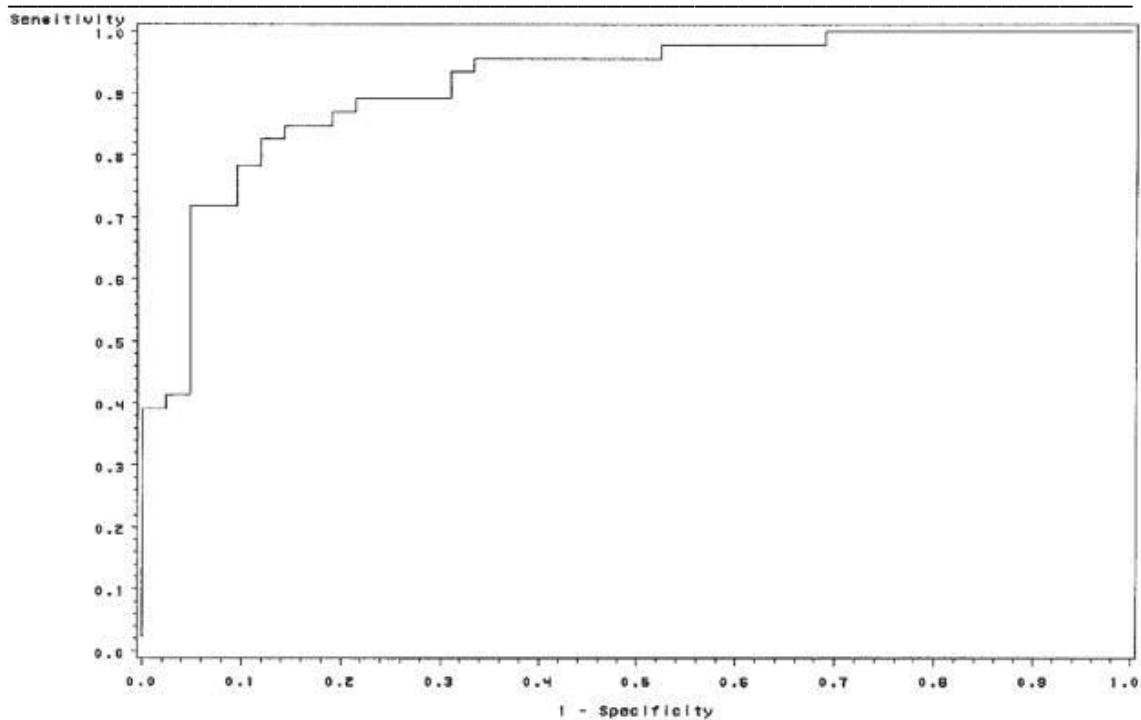


Figura 7- Curva de ROC para valores de VEGF e EGF salivares em amostras de indivíduos controlo e pacientes com carcinoma da mama. Área sob a curva de ROC, 84%.

Fonte: (Brooks et al., 2008) Reproduzido com permissão de Spandidos Publications.

### 8.1.2) CA 15-3

O antígeno do cancro 15-3 é uma glicoproteína de 300-400Kd, produzida pelas células epiteliais glandulares e apenas 1,3% da população sadia tem CA 15-3 elevado. É um marcador tumoral, principalmente do carcinoma de mama, que varia de acordo com o estadiamento da doença, aumentando a sua concentração face à progressão da doença. (Almeida et al, 2007)

O CA 15-3 é um antígeno carcinoma-associado, que é identificado por dois anticorpos monoclonais designados Mab D11-5 e Mab DF3. (Streckfus et al., 1999)

Atualmente, o marcador tumoral CA 15-3 é um dos marcadores mais utilizados para o carcinoma de mama, sendo recomendado para a avaliação da resposta à terapia e na monitorização. Não há evidências para eficácia deste marcador na triagem da doença, já que, CA 15-3 é apenas elevado em apenas 3% dos pacientes com doença localizada e é elevado em até 70% de pacientes com doença metastática. (Quaranta et al., 2007)

Agha-Hosseini, Mirzaii-Dizgah e Rahimi, (2009) efetuaram um estudo com o objetivo de avaliar a relação entre os níveis séricos e salivares do antígeno do cancro 15-3, comparando-os entre mulheres com e sem carcinoma de mama. Participaram 61 mulheres, incluindo mulheres com e sem patologia. Os níveis de CA15-3 foram analisados no soro e na saliva (total estimulada) por EIA (Imunoensaio Enzimático). Os níveis salivares e séricos de CA15-3, em pacientes com cancro, foram significativamente maiores ( $P < 0,01$ ) do que os níveis salivares e séricos do grupo de controlo saudáveis. Os valores também foram maiores no estágio 2 do que no estágio 1, em pacientes com cancro.

Ainda para o mesmo estudo houve uma correlação positiva significativa da concentração de CA15-3 entre o soro e a saliva ( $r = 0.614$ ) e também entre a concentração sérica e o “output” do CA15-3 salivar ( $r = 0.541$ ) (Figura 8).

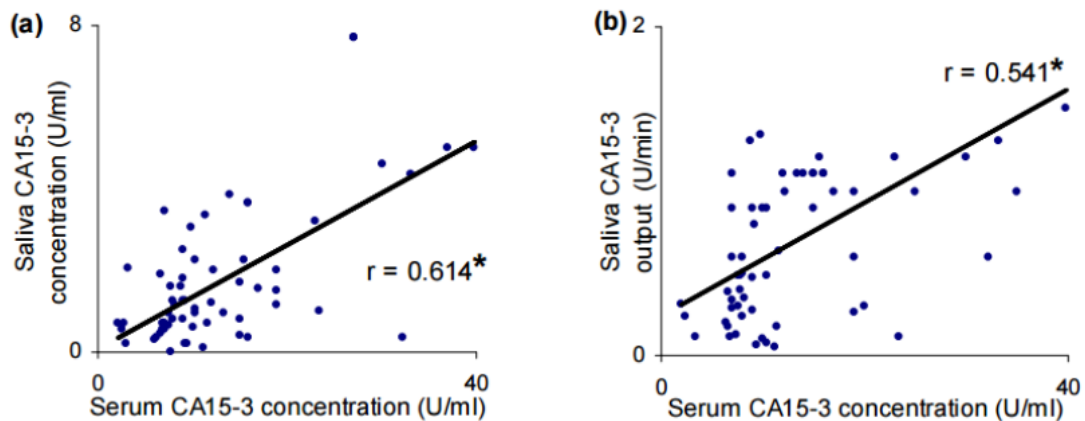


Figura 8- Relação entre a concentração sérica e salivar do CA15-3. Fonte: (Agha-Hosseini, Mirzaii-Dizgah e Rahimi, 2009) Reproduzido com permissão do autor Prof. Farzaneh Agha-Hosseini.

Mais recentemente Laidi et al., (2014) realizaram um estudo idêntico ao anterior, com o objetivo de avaliar a relação entre as concentrações séricas e salivares da proteína CA 15-3 em 60 pacientes, 29 com carcinoma de mama e 31 voluntários assintomáticos saudáveis. Os níveis de CA15-3 foram também analisados por EIA. O resultado da comparação da concentração de CA15-3 na saliva e no sangue, entre casos diagnosticados e casos controlo, não foi estatisticamente significativo ( $p > 0,05$ ), porém, a correlação entre a

concentração salivar e sérica foi positiva e estatisticamente significativa ( $r=0,27$ ,  $p=0,03$ ).

### **8.1.3) C-erbB-2/ HER2 e CA 15-3**

O C-erbB-2 é um oncogene com peso molecular de 185Kd. São encontrados, na literatura, vários nomes para este marcador como: c-erbB-2; cerbB-2; C-erbB-2; HER-2; HER-2/neu; HER2; ERBB2; erbB2; e neu/c-erbB-2. O oncogene C-erbB-2 pertence a uma família de recetores de membrana sendo amplificado e em 20% a 40% dos carcinomas primários de mama, sendo que a relação entre o c-erbB-2 e o prognóstico do cancro da mama tem sido extensivamente examinado, com considerável atenção à recidiva tumoral e à sobrevida das pacientes. (Almeida et al, 2007)

Atualmente, dois métodos de teste são aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA) para a avaliação do c-erbB-2 no laboratório, são a análise imuno-histoquímica (IHQ) e a *Fluorescence In Situ Hybridization* (FISH). (Streckfus et al., 2012)

O c-erbB-2 tem sido extensamente estudado em carcinomas da mama desde que se demonstrou uma associação entre a sua amplificação e um mau prognóstico. Vários autores encontraram que a expressão aumentada de c-erbB-2 é um indicador de mau prognóstico. Pacientes cujos tumores exibem expressão aumentada de c-erbB-2 apresentam uma sobrevida menor. (Eisenberg e Koifman, 2001)

A proteína c-erbB-2, tem sido um marcador do cancro da mama testado em biópsias de tecidos, a partir de mulheres diagnosticadas com tumores malignos. Estudos sugerem que os fragmentos solúveis do oncogene c-erbB-2 podem ser libertados na superfície da célula e, desta maneira, tornam-se detetáveis em pacientes com carcinoma da mama. (Streckfus et al., 2000b)

Para determinar a utilidade deste oncogene, Streckfus et al., (2000b) dosearam o c-erbB-2 na saliva e no sangue, utilizando kits de ELISA em três grupos diferentes de mulheres. Os níveis salivares e sorológicos de c-erbB-2 entre os pacientes com cancro foram significativamente maiores ( $p<0,001$ ) do que nos grupos de controlo saudáveis e pacientes com tumor benigno. Estes resultados foram comparáveis com os níveis de c-

erbB-2 analisados no sangue (Figura 9). Com os valores de coorte obtidos neste estudo, as concentrações salivares e séricas de c-erbB-2 foram capazes de detetar 87 e 94% dos indivíduos com carcinoma da mama, respetivamente.

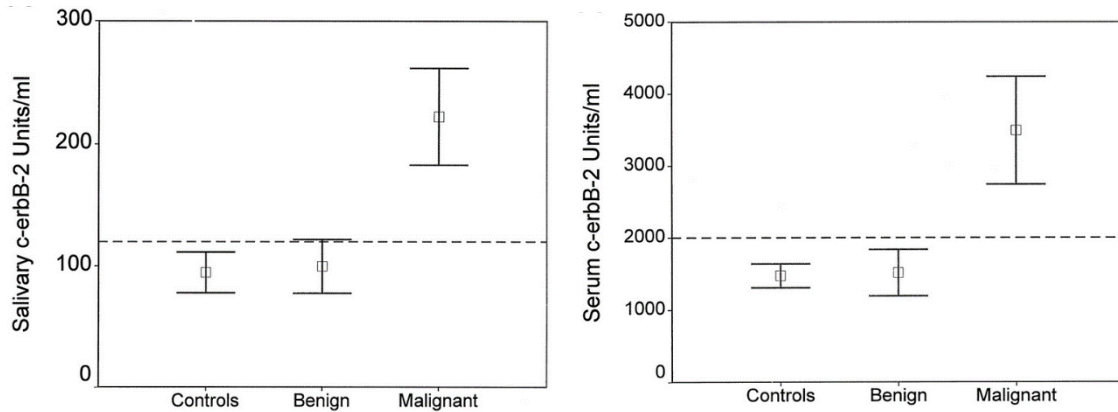


Figura 9- Valores médios salivares e séricos de c-erbB-2 para os três grupos de mulheres. Fonte: (Streckfus et al., 2000b) Reproduzido com permissão de American Association for Cancer Research (Anexo 6).

Streckfus et al., (1999) compararam e avaliaram as concentrações dos marcadores CA 15-3 e c-erbB-2 respetivamente, face ao hábito tabágico, estado de menopausa, uso de estrogênio, doenças sistêmicas, medicação prescrita, raça e idade. Os resultados deste estudo sugerem que tais fatores não têm efeito significativo sobre as concentrações salivares dos dois marcadores. Não há também nenhuma associação estatística entre os marcadores e as variáveis independentes descritas. Os investigadores determinaram ainda que as células do epitélio oral não contribuíram para os níveis do marcador, a presença da doença periodontal não teve nenhum efeito nos níveis do marcador e o ciclo menstrual não teve efeito sobre os níveis salivares de marcador.

Streckfus et al., (2001) avaliaram a confiabilidade das concentrações solúveis de c-erbB-2 na saliva de homens e mulheres saudáveis. Neste estudo os investigadores descobriram a presença da proteína c-erbB-2 na saliva de ambos os grupos (homens e mulheres saudáveis). Os níveis salivares de c-erbB-2 não foram significativamente diferentes quando comparados para as diferenças de gênero.

Bigler et al., (2002) realizaram um estudo para averiguar a utilidade do oncogene c-erbB-2 no seguimento de pacientes com carcinoma da mama. Foram incluídos 25 pacientes na

investigação, com diferentes diagnósticos histológicos e estágios de cancro. Foram realizados ensaios de ELISA para c-erbB-2 e CA 15-3 em amostras de soro e de saliva (total estimulada), recolhidos em todos os doentes antes de qualquer terapia adjuvante ou cirurgia e sequencialmente durante a terapia. A figura 10 representa um exemplo de acompanhamento.

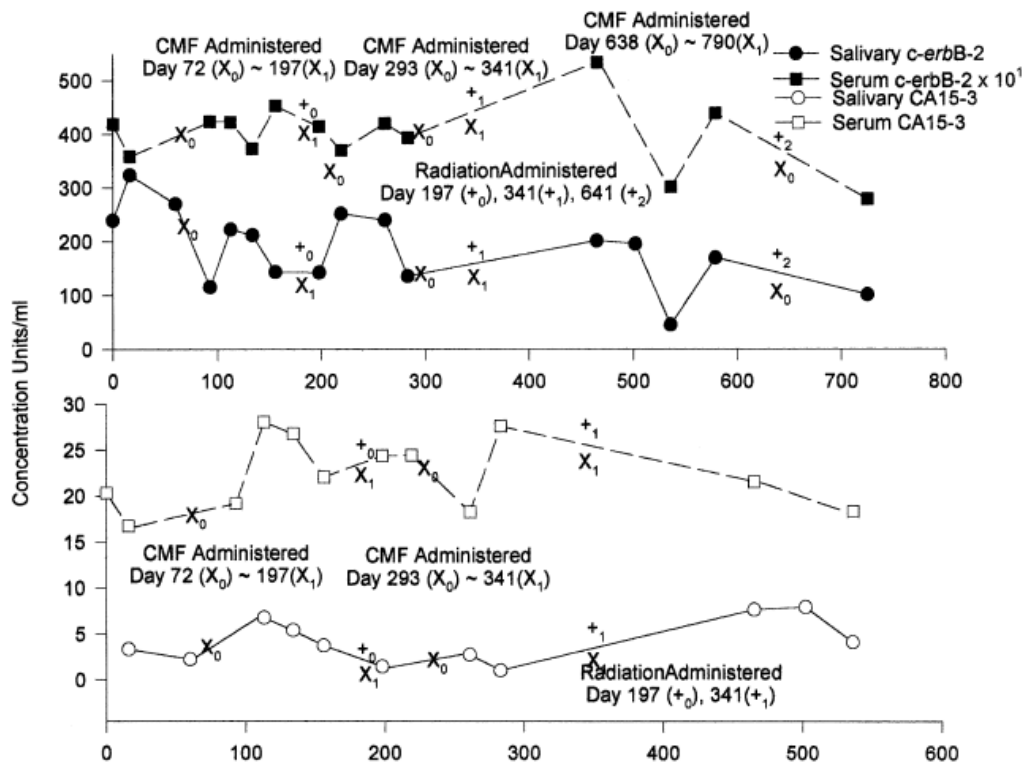


Figura 10- Exemplo de acompanhamento pós-operatório. O gráfico superior representa as concentrações salivares e séricas de c-erbB-2 ao longo do tempo de tratamento. O gráfico inferior representa as concentrações salivares e séricas de CA 15-3 ao longo do tempo de tratamento. Fonte: (Bigler et al., 2002) Reproduzido com permissão de John Wiley and Sons (Anexo 7).

Conforme observado na Figura 10, os resultados do estudo demonstraram que as concentrações de c-erbB-2 respondem ao tratamento e podem detetar recorrência ao longo do tempo.

#### 8.1.4) Proteomas e transcriptomas

Estudos exploratórios avaliavam o potencial da utilização de proteínas salivares, tais como c-erbB-2, VEGF, EGF e CEA, na deteção e/ou follow-up do carcinoma da mama. No entanto, tais investigações não foram baseadas na descoberta de novos marcadores, em vez disso, grande parte dos investigadores apenas testavam biomarcadores de sangue na saliva. (Zhang et al., 2010)

Zhang et al., (2010) identificaram oito biomarcadores de mRNA (CSTA; TPT1; IGF2BP1; GRM1; GRIK1; H6PD; MDM4 e S100A8) e um biomarcador de proteína (CA6) capazes de diagnosticar carcinoma da mama, sendo que foram utilizadas tecnologias *Affimetrix HG-U133-Plus-2.0Array* e *2D-DIGE* respetivamente. Como representado na figura 11, estas duas tecnologias foram capazes de revelar uma variação significativa entre os pacientes com cancro e os controlo, com uma precisão de 92 % (83% de sensibilidade e 97% de especificidade). Os transcriptomas foram validados usando RT-qPCR e os biomarcadores de proteómica foram validados com *quantitative protein immunoblot*, também conhecido por *western blot*.

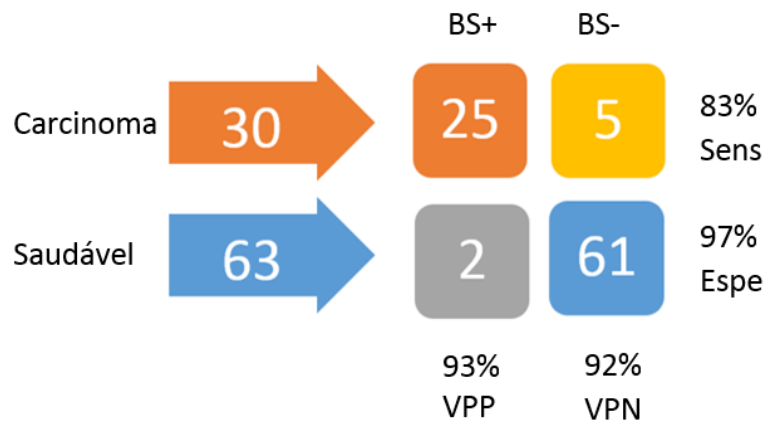


Figura 11 - Combinação de nove biomarcadores validados com uma sensibilidade de 83% (25 de 30 pacientes com carcinoma), com apenas uma taxa de falso-positivo de 3% (2 dos 63 indivíduos do grupo controlo). O “BS+” e o “BS-” referem-se aos testes de biomarcador salivar positivo ou negativo respetivamente; o “VPN” e o “VPP” ao valor preditivo negativo e ao valor preditivo positivo respetivamente; o “Sens”, à sensibilidade; e a “Espe”, à especificidade. Baseado em: (Zhang et al., 2010).

### 8.1.5) Metabolitos

Recentemente Sugimoto et al., (2010) levaram a cabo uma investigação onde analisaram a saliva de 215 indivíduos por abordagens metabolómicas. Desses 215 indivíduos, 68 tinham cancro oral, 18 cancro do pâncreas, 30 carcinoma da mama, 11 com doença periodontal e 87 controlo saudáveis. Usando *Capillary Electrophoresis Time-Of-Flight Mass Spectrometry* (CE-TOF-MS) identificaram 57 metabolitos principais, que podem ser usados para prever com precisão a probabilidade de ser afetado por cada doença. Os perfis de metabolitos quantificados para os três cancros apresentaram-se em concentrações relativamente mais altas, quando comparados com pessoas saudáveis e sujeitos com doença periodontal. As AUC foram calculadas para discriminar controlo saudáveis de cada doença. As AUC foram de: 0,865 para o cancro oral, 0,973 para o carcinoma de mama (figura 12), 0,993 para cancro do pâncreas e 0,969 para as doenças periodontais. A precisão dos modelos foi também alta, com uma validação cruzada de 0,810; 0,881; 0,994 e 0,954 respetivamente.

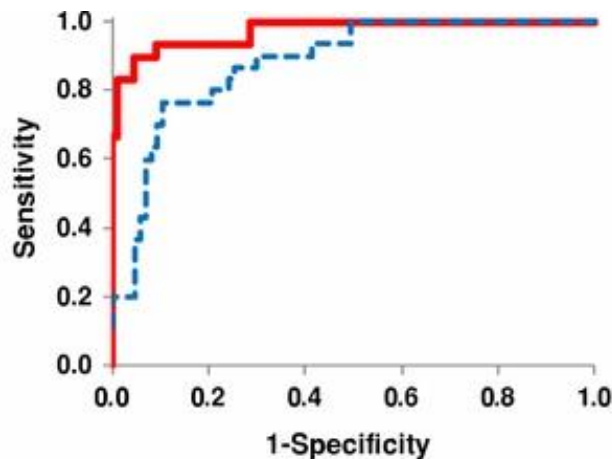


Figura 12- Análise da curva ROC para a capacidade dos metabolitos salivares discriminarem amostras entre sujeitos saudáveis e pacientes com carcinoma da mama (n = 30). AUC= 0,973. Precisão dos modelos, com uma validação cruzada de 0,881. Fonte: (Sugimoto et al., 2010) Reproduzido com permissão de Springer (Anexo 8).

### **8.1.6) Calicreína**

Há relatos de que a calicreína pode ser usada como um marcador para o carcinoma da mama, já que investigadores referem o uso da saliva para detetar variações nas concentrações de calicreína, uma protéase reguladora, entre indivíduos saudáveis e pacientes com tumores gastrointestinais e malignos da mama. Investigações revelaram concentrações mais altas de calicreína salivar entre pacientes diagnosticados com tumores malignos, em comparação com aqueles indivíduos diagnosticados com tumores benignos ou aqueles de uma coorte de indivíduos saudáveis, sendo as concentrações medidas por meio de ensaio *Cromogenic Tripeptide Assay*. (Streckfus et al., 2007)

### **9) Recolha salivar**

Qualquer procedimento de diagnóstico salivar começa por recolher as amostras necessárias. Embora simplista, de muitas maneiras, a colheita salivar pode manifestar vários problemas em determinadas populações, sendo eles: a taxa de fluxo salivar; o ritmo circadiano; o tipo de glândula salivar; o tipo de estímulo salivar; a dieta; a idade; a medicação; o estado fisiológico e o método de recolha. (Dawes, 1993)

Devido a tais condicionantes, são tomadas algumas medidas cautelares, tais como: a amostra deve ser recolhida entre as 9:00h e as 10:00h da manhã, para reduzir a influência do ciclo circadiano em cada participante; sempre que possível utilizar pacientes do mesmo sexo; os pacientes devem ainda ser avisados para que não comam, bebam, mascem chiclete, façam exercícios, fumem, ou escovem os dentes por até 2 horas antes da recolha. Para além disso, durante o exercício de coleta o ambiente deverá estar bem ventilado e os indivíduos deverão estar sentados de forma ereta e relaxados por 5 minutos. (Santos et al., 2007)

A saliva pode ser recolhida como sendo não estimulada (repouso), ou em condições estimuladas. A saliva estimulada é recolhida após o paciente mastigar um pedaço de parafina e/ou pela aplicação de 0,1-0,2 mol/L (cerca de 1 gota) de ácido cítrico na língua. (Pfaffe et al., 2011) Secreções estimuladas produzem cerca de três vezes o volume de secreções não estimuladas. A técnica de parafina parece ser uma técnica precisa, uma vez

que tem um intervalo de confiança de  $r=0,95$  e uma variância de 11, sendo normalmente recomendada pelos autores para a descoberta de biomarcadores (Streckfus et al., 2007)

Streckfus et al., (2007) apontam ainda para a aplicação de cinco gotas de solução de ácido cítrico 1 a 6% no dorso da língua a cada 30 segundos. A saliva acumula na boca é expetorada intermitentemente por um período de cinco minutos, produzindo grandes quantidades de saliva, no entanto, a confiabilidade é de apenas  $r=0,76$  e apresenta uma variância de 0,49.

A saliva pode também ser obtida das glândulas individuais usando canulação dos ductos glandulares ou pela aplicação de dispositivos de recolha específicos na área onde surgem os ductos glandulares. No entanto, estes procedimentos são complexos, morosos e mais invasivos exigindo pessoal qualificado. (Pfaffe et al., 2011)

Cerca de 10 métodos têm vindo a ser utilizados: o método da expetoração; o método da sucção aberta; o método da sucção fechada; o método de drenagem; o método do papel de filtro; o método dos cones endodônticos de papel absorvente; o método de esfregaço; o método “*salivette*”; o método “*eyespears*” e o método “*ultrafiltration probe*”. (Santos et al., 2007) Um dos métodos mais fiáveis é o método de sucção com uma fiabilidade de  $r=0,93$  e uma variância de 0,14, no entanto, é necessária uma bomba de vácuo para recolher as amostras. (Streckfus et al., 2007)

As amostras são depois submetidas a temperaturas próximas dos  $-80^{\circ}$  C. Normalmente a primeira amostra é descartada devendo as outras ser misturadas a uma solução de benzamidina 0,2M em água destilada para prevenir a proteólise devido à presença de enzimas (antes da congelação). (Santos et al., 2007)

Atualmente existem empresas que fabricam dispositivos de coleta de saliva para fins de diagnóstico e de pesquisa. Estes incluem: OraSure® Oral Specimen Collection Device (OraSure Technologies); QUantisal™ Oral Fluid Collection Device (Immunoanalysis Corporation); Salivette® (Sarstedt); ORACOL Saliva Collection Kit (Malvern Medical); UltraSal-2™ Split Sample Saliva Collection Device (IDS/Neogen U.S); Versi-SAL® Oral Fluid Collection Device (Oasis Diagnostics); OraQuick Advance® HIV/2 Rapid Oral HIV Test (OraSure Technologies); DDS Rapid Drugs of Abuse System (Cozart

Biosciences); Securetec AG Drugwipe ® 5; OraGene ® DNA Salivary DNA Collection Device (DNA Genotek); DNA-SAL™ Salivary DNA Collection Device (Oasis Diagnostics); SCS Collection System (Greiner Bio-One); Saliva Collection Aid (SalivaBio); Super-SAL™ (Oasis Diagnostics) e iSCPSS RNA/Protein Collection System (Oasis Diagnostics). (Slowey, 2013)

Apesar dos métodos drenagem, cuspir, e sucção continuarem a ser os mais comuns, não continua a haver nenhuma técnica universal para a recolha de amostras, um fato que pode dificultar o processo de investigação, inibindo a reprodução confiável de resultados. Tendo estabelecidas diretrizes, padronizando o procedimento, poder-se-ia resolver quaisquer problemas de confusão entre investigadores e aliviar um pouco a variabilidade entre indivíduos e populações. (Lee e Wong, 2009)

## **10) Perspetivas Futuras**

Nos últimos anos, muitas questões biológicas importantes foram respondidas pelo estudo das "ômicas", permitindo a descoberta de vários biomarcadores salivares. A transferência de conhecimento científico de biomarcadores salivares para aplicações clínicas é um processo complicado, sendo que a sua aplicação na prática clínica vai depender de estudos colaborativos entre médicos, epidemiologistas, biólogos e bioinformáticos, com uma questão clínica relevante e com parâmetros bem definidos de recrutamento e caracterização de pacientes e amostras. (Silva et al., 2015)

Espera-se que esta nova metodologia abranja até mesmo as comunidades mais remotas ou pobres onde só as pessoas minimamente treinadas estão disponíveis. A necessidade de um diagnóstico não-invasivo torna-se particularmente importante nos países em desenvolvimento, onde muitos riscos para a saúde e as doenças continuam a ser mal definidos e a receber tratamentos inadequados. Esta tecnologia pode então ter o maior impacto nas comunidades que atualmente não recebem laboratório adequado ou outros serviços de saúde. (Segal et.al,2008)

O desafio de tornar um diagnóstico salivar numa realidade clínica é estabelecer a base científica e validações clínicas necessárias, através de tecnologias altamente precisas e viáveis para atingir o ponto definitivo de avaliação do estado de saúde e de doença dos

indivíduos. (Lee et al., 2010) Os desafios confrontam os profissionais em todas as fases, incluindo a fabricação, a integração de componentes individuais, a validação, a aprovação regulamentar e finalmente, a comercialização. (Lee e wong, 2008)

As barreiras para a implementação generalizada de diagnósticos salivares derivam de problemas tecnológicos, tais como sensibilidade, miniaturização, produtividade, automação, custo e velocidade. Estas barreiras à detecção de marcadores na saliva foram largamente ultrapassados, através de técnicas emergentes de diversas áreas, como genómica de alto rendimento, abordagens proteómica e transcritómica. Tecnologias de diagnóstico miniaturizado trarão informações críticas de saúde do paciente, utilizando apenas pequenas quantidades de fluidos corporais. Estas plataformas “*Lab-on-a-Chip*” (LOC) irão realizar várias operações em paralelo e permitir a avaliação simultânea de múltiplas condições em ambientes não-laboratoriais, como hospital, clínica, local de trabalho ou em casa, podendo ainda fornecer aos clínicos estratégias de prevenção e terapêuticas para atender às necessidades do paciente. (Segal et.al,2008)

Há uma necessidade crescente para o “*Point-Of-Care*” (POC), ferramentas de diagnóstico simples e conveniente em países em desenvolvimento. A falta de informações sobre a doença, seguindo-se a falta de orientações para a manutenção da saúde e gestão da doença resultam em maus prognósticos e altas taxas de mortalidade. As novas tecnologias de miniaturização irão oferecer uma mudança revolucionária na medicina. (Lee e wong, 2008)

Os sistemas de detecção de biomarcadores *multiplex* têm surgido através de um progresso notável no desenvolvimento de tecnologias LOC (figura 13). O objetivo foi e continua a ser a construção de plataformas automatizadas, miniaturizadas, e multiplexadas para ensaios rápidos e leitura. Em geral, os princípios do teste ELISA e/ou hibridização de ácidos nucleicos são aplicados frequentemente com sensores eletroquímicos. A abordagem eletroquímica utiliza matrizes de eletrodos de ouro (*multiplex chips*), na qual um conjunto de eletrodos é usado para a medição de um analito, seguida de *amperometric readout*. (Yeh et al., 2010)

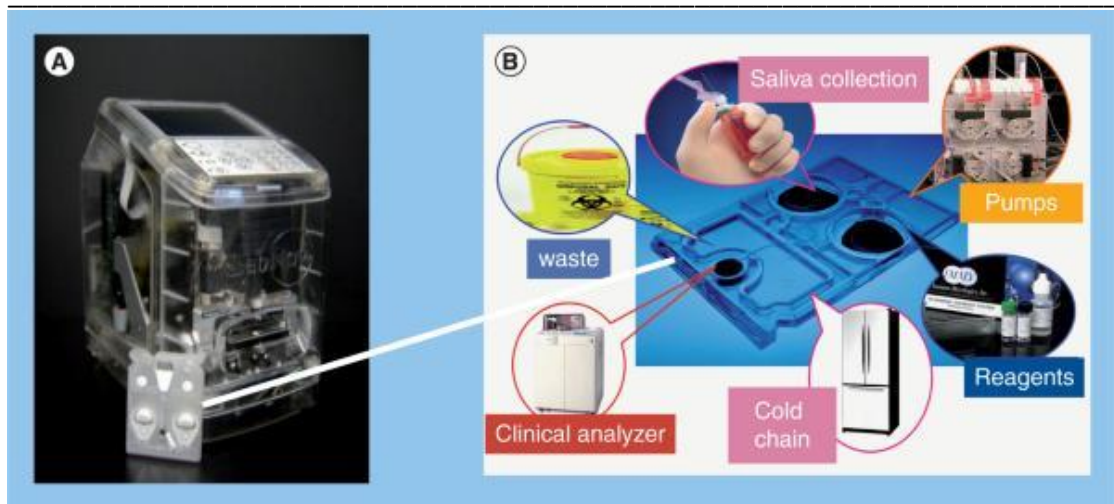


Figura 13- Exemplo de “*Lab-on-a-Chip*”. A- LabNow; B-Nano-Biochip. Fonte: (Miller et al., 2010) Reproduzido com permissão de Future Medicine Ltd (Anexo 3).

Depois de realizada a análise, a amostra é dirigida para um reservatório de resíduos presente no chip, que fornece uma contenção segura de fluidos biológicos perigosos. Outra vantagem será o seu descarte como resíduo sólido após o ensaio, facilitando a gestão de resíduos de risco biológico. Estas características facilitam a transição das técnicas habituais laboratoriais para um LOC e assim oferecem oportunidades importantes para as necessidades de tecnologia POC. (Miller et al., 2010)

Profissionais de saúde e outras entidades específicas podem agora usar testes salivares para detetar anticorpos contra o HIV e para determinar os níveis de estrogênio, álcool e drogas ilícitas. O público em geral, no entanto, tem acesso a muitos mais testes. Farmacêuticas fornecem agora kits de testes de saliva em casa para o colesterol, antígeno específico da próstata e outras hormonas. (Pfaffe et al., 2011)

Deste modo, a utilização de saliva como um fluido de diagnóstico vai ser cada vez mais aceite, permitindo uma melhoria da saúde sistémica ou oral. (Silva et al., 2015)

Dr. David Wong (Universidade da Califórnia, Los Angeles) e colaboradores, desenvolveram um dispositivo POC conhecido como “*Oral Fluid Nanosensor Test*” (OFNASET), que pode detetar cancro oral com elevada sensibilidade e especificidade. O OFNASET usa um sistema integrado que vai permitir a deteção simultânea e rápida de proteínas salivares e múltiplos alvos de ácidos nucleicos. Os investigadores pretendem

ainda alargar o projeto a outras doenças como o carcinoma da mama, cancro do pulmão e do pâncreas. (Lee e Wong, 2009; Segal e Wong, 2009; Vogell, 2014; disponível em: <http://hspp.dent.ucla.edu/about.html>)

Atualmente existem plataformas POC para a detecção de doenças cardiovasculares, especialmente do enfarte agudo do miocárdio, para avaliação da doença periodontal e cancro oral. (Yeh et al., 2010)

Há conceitos definidos como “Medicina Personalizada” que surgem na literatura mais recente que advogam toda a sua base clínica em especialidades genéticas algumas das quais podem ser obtidas por princípios semelhantes aos descritos.

*“O progresso científico na área da genómica, a finalização do “Projeto do Genoma Humano” e a capacidade de sequenciar genomas inteiros a preços cada vez mais competitivos originaram a promessa de revolucionar a área da saúde e colocar desafios importantes a alguns conceitos tradicionais nas áreas da ética e do direito biomédico.”* (Cordeiro, 2014)

O “Projeto do Genoma Humano” constitui o maior projeto de investigação biomédica das últimas duas décadas. Atualmente os investigadores tentam transpor a ciência do genoma para a prática em saúde pública e em medicina. Com isto chegamos à “Medicina Personalizada”, onde o diagnóstico avalia o tratamento adequado para cada paciente em particular e desta maneira o profissional de saúde será capaz de melhorar os seus diagnósticos e posteriormente os tratamentos. O “Projeto do Genoma Humano” pode ser descrito como uma “caminhada” em busca da cura para a doença, particularmente para o cancro. Deste modo, a “Medicina Personalizada” apresentará maiores benefícios, tanto para o médico como para o paciente. (Annas, 2014)

### III) DISCUSSÃO

Depois de confirmada, em estudos preliminares, a presença de marcadores do carcinoma da mama na saliva, os investigadores avaliaram as suas concentrações em grupos de controlos saudáveis, em pacientes com a doença e em pacientes com tumor benigno.

Das investigações conduzidas por Streckfus et al., (2000a); Streckfus et al., (2000b); Brooks et al., (2008), Navarro et al., (1997) e Agha-Hosseini, Mirzaii-Dizgah e Rahimi, (2009) resultaram altas concentrações de c-erbB-2, de CA 15-3, de EGF, de CEA, e VEGF em pacientes com carcinoma da mama face aos controlos saudáveis e aos pacientes com tumor benigno. Na maior parte dos estudos, o c-erbB-2 é o marcador tumoral que oferece mais segurança, devido à diferença significativa de concentrações, capaz de detetar a maior parte dos indivíduos com carcinoma da mama.

Bigler et al., (2002) complementaram os estudos de Streckfus, que decorreram ao longo de vários anos, mostrando mais uma vez que o c-erbB-2 é um marcador de preferência, dado as suas concentrações salivares responderem ao tratamento e poderem detetar recorrências.

Para que um marcador tumoral fosse verdadeiramente confiável, a sensibilidade e a especificidade deveriam tender a 100%, o que na realidade dificilmente se verifica.

Perante os resultados obtidos pelos diversos investigadores, pode ter-se em conta que nenhum apresentou sensibilidades nem especificidades de 100%, sendo que a sensibilidade se refere à capacidade do teste diagnóstico detetar os indivíduos verdadeiramente positivos, ou seja, de diagnosticar corretamente os doentes e a especificidade se refere à capacidade de detetar os verdadeiros negativos, ou seja, de diagnosticar corretamente os indivíduos livres de doença.

Embora alguns resultados se apresentem com sensibilidades e especificidades ligeiramente altas, estes são ainda capazes de conduzir a falsos positivos e a falsos negativos. Sendo assim, um teste será mais sensível quando apresentar menos resultados falsos negativos e mais específico quando apresentar menos resultados falsos positivos.

Dadas estas circunstâncias, um ponto de corte ideal para um teste, é escolhido quando a sensibilidade e a especificidade estão o mais elevadas possível.

Com avanços tecnológicos nas diversas áreas das ómicas, os investigadores têm vindo a conseguir melhores resultados e deste modo diminuir a probabilidade de falsos positivos e falsos negativos. Zhang et al., (2010) através da identificação de 8 biomarcadores de mRNA e 1 biomarcador de proteína conseguiram obter percentagens mais elevadas do que as conseguidas até ao momento (83% de sensibilidade e 97% de especificidade). Sugimoto et al., (2010) obtiveram também bons resultados através da identificação de 57 metabolitos. Os resultados foram capazes de discriminar amostras entre sujeitos saudáveis e pacientes com carcinoma da mama com uma área sob a curva de ROC de 0,973.

Para analisar o desempenho dos testes de diagnóstico, alguns autores utilizaram a curva de ROC, de maneira a discriminar pacientes sadios e doentes. A curva de ROC consiste numa representação gráfica da taxa de verdadeiro-positivo (sensibilidade), contra a taxa de falso-positivo (1 - especificidade), determinando-se assim a acurácia do teste, ou seja, a capacidade de discriminar os pacientes corretamente. Tal acurácia é avaliada pela área sob a curva ROC.

Com base nas provas apresentadas nesta revisão, os investigadores acreditam nas capacidades que a saliva apresenta. Considerando as vantagens logísticas de testes de diagnóstico salivar, os investigadores continuam a explorar a possibilidade de utilizar a saliva como um meio para detetar cancro da mama. Agora, utilizando as mais recentes tecnologias, são claramente justificadas as razões pelas quais os investigadores apostavam em estudos preliminares.

De forma a compilar os aspetos mais relevantes, segue-se uma síntese em configuração de tabela (tabela 4).

A Utilização da Saliva como Substrato de Diagnóstico e “Follow-up”  
do Carcinoma da Mama

<b>Biomarcadores salivares para o carcinoma da mama</b>			
<b>Biomarcador</b>	<b>Método usado</b>	<b>Resultados</b>	<b>Referência</b>
CA15-3	EIA	Os níveis salivares e séricos foram significativamente maiores do que os níveis salivares e séricos de controlos saudáveis. Houve ainda uma correlação positiva significativa da concentração entre o soro e a saliva.	Agha-Hosseini, Mirzaii-Dizgah e Rahimi, (2009)
	EIA	A correlação entre a concentração salivar e sérica foi positiva e estatisticamente significativa.	Laidi et al., (2014)
C-erbB2	ELISA	Os níveis séricos e salivares da proteína entre pacientes com cancro da mama foram significativamente maiores do que nos grupos controlo e com tumor benigno. As concentrações de c-erbB-2 respondem ao tratamento e podem detetar recorrências.	Streckfus et al., (2000a; 2000b; 2001 e 2005) e Bigler et al., (2002)
Transcriptomas e proteomas	Affymetrix HG U133 Plus 2.0 Array, 2D-DIGE	8 biomarcadores de mRNA (CSTA; TPT1; IGF2BP1; GRM1; GRIK1; H6PD; MDM4 e S100A8) e 1 de proteína (CA6), capazes de discriminar doentes de controlo obtiveram uma acurácia de 92% (83% de sensibilidade e 97% de especificidade).	Zhang et al., (2010)
Proteínas: VEGF; EGE e CEA	ELISA	Os níveis de proteína em fluidos salivares foram significativamente elevados em pacientes com cancro. A melhor previsão foi a combinação de VEGF e EGF.	Brooks et al., (2008)
57 Metabolitos	Capillary Electrophoresis Time-Of-Fight Mass Spectrometry (CE-TOF-MS)	57 metabolitos principais podem ser usados para detetar carcinoma da mama. Foram discriminados controlos saudáveis de doentes com uma área sob a curva de ROC de 0,973.	Sugimoto et al., (2010)

Tabela 4- Biomarcadores salivares para o carcinoma da mama.

#### IV) CONCLUSÃO

Um teste de saliva não se destina a substituir os testes de rastreio do cancro da mama, como a mamografia e o exame clínico das mamas realizados pelo médico. No entanto, será um suplemento valioso quando conjugado com os métodos de rastreio já conhecidos, ou poderá ser utilizado como um teste de monitorização/*follow-up*, se um exame imagiológico, ou um teste anatomopatológico confirmar uma anormalidade da mama.

Vale ainda ressaltar que os biomarcadores salivares diferem dos biomarcadores séricos convencionais. Um dos obstáculos tecnológicos no desenvolvimento de diagnósticos salivares são as baixas concentrações encontradas na saliva, em relação ao sangue (100 a 1000 vezes mais baixa na primeira matriz). (Pfaffe et al., 2011)

Um teste de saliva barato, usado em conjunto com uma mamografia, por exemplo, pode aumentar o valor do diagnóstico geral do teste e reduzir o número de falsos positivos e negativos, permitindo que um diagnóstico do carcinoma da mama seja feito numa fase precoce, resultando num melhor prognóstico, acompanhado de tratamentos menos intensivos.

O C-erbB-2 foi o marcador tradicional que melhores resultados obteve em todas as investigações, sendo portanto um grande futuro candidato dos “diagnósticos salivares”, já que este permite a deteção inicial e recorrências do carcinoma da mama.

Os proteomas, os transcritomas e os metabolitos são ainda potenciais biomarcadores candidatos ao carcinoma da mama, o que trarão também grande impacto a estas novas tecnologias. Estudos recentes revelaram grandes capacidades destes biomarcadores em detetar e discriminar indivíduos saudáveis de doentes.

A evolução de tecnologias de identificação e quantificação permitirá aos investigadores a obtenção de melhores resultados. É ainda necessário um maior número de amostras de pacientes, principalmente de diferentes instituições para uma validação adicional e futura aplicação clínica destes recentes métodos. A padronização de métodos/procedimentos, o estabelecimento de normas e intervalos de referência, contribuirão para que os testes salivares se tornem uma realidade, uma necessidade crescente para o “Point-Of-Care”.

## V) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agha-Hosseini, F., et al. (2009). "Correlation of serum and salivary CA15-3 levels in patients with breast cancer." *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 14(10), pp. 521-24.

Almeida, C. et al. (2007). "Marcadores Tumorais: Revisão de Literatura". *Rev Bras de Canc*. 53(3), pp. 305-16.

Almeida, V., et al. (2008). "Saliva composition and functions: a comprehensive review." *J Contemp Dent Pract*. 9(3), pp. 72-80.

Al-Tarawneh, S. K., et al. (2011). "Defining salivary biomarkers using mass spectrometry-based proteomics: a systematic review." *OMICS*. 15(6), pp. 353-61.

Al-Tarawneh, S. K. and S. Bencharit (2009). "Applications of Surface-Enhanced Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight (SELDI-TOF) Mass Spectrometry in Defining Salivary Proteomic Profiles." *Open Dent J*. 3., 74-79.

Amado, F. *et alli* (2007) Proteomics of Human Saliva. In:Thongboonkerd V. (Ed.). *Proteomics of Human Body Fluids: Principles, Methods, and Applications*. Totowa. Humana Press, pp. 347-75.

Amerongen, A., et al. (2004). "Salivary proteins: protective and diagnostic value in cariology?" *Caries Res*. 38(3), pp. 247-53.

Annas, G. (2014). Personalized medicine or public health? Bioethics, human rights, and choice. *Rev Port. Saúde Pública*. 32(2), pp.158–63.

ASCO. Follow-Up Care for Breast Cancer. [Em Linha]. Disponível em <<http://www.cancer.net/research-and-advocacy/asco-care-and-treatment-recommendations-patients/follow-care-breast-cancer>>. [Consultado em 08/06/2015].

ASCO. ASCO Creating Guidelines for Management of Metastatic and Early-Stage Invasive Breast Cancer. [Em Linha]. Disponível em <<https://am.asco.org/asco-creating>>.

guidelines-management-metastatic-and-early-stage-invasive-breast-cancer>.

[Consultado em 08/06/2015].

Barbosa, E. B. et al. (2012). "Proteômica: metodologias e aplicações e aplicações no estudo de doenças humanas". *Rev da Assoc Méd Bra.* 58(3), pp. 366-75.

Bigler, L. R., et al. (2002). "The potential use of saliva to detect recurrence of disease in women with breast carcinoma." *J Oral Pathol Med.* 31(7), pp. 421-31.

Bonne, N. J. and D. T. Wong (2012). "Salivary biomarker development using genomic, proteomic and metabolomic approaches." *Genome Med.* 4(10), pp. 82.

Brooks, M. N., et al. (2008). "Salivary protein factors are elevated in breast cancer patients." *Mol Med Rep.* 1(3), pp. 375-78.

Campo, J., et al. (2006). "Oral transmission of HIV, reality or fiction? An update." *Oral Dis.* 12(3), pp. 219-28.

Cordeiro, J. (2014). Ethical and legal challenges of personalized medicine: Paradigmatic examples of research, prevention, diagnosis and treatment. *Rev Port. Saúde Pública.* 32(2), pp.164–80.

Cova, M. A. M. et al. (2015). Salivary Omics. In: Streckfus C. (Ed.). *Advances in Salivary Diagnostics.* New York Dordrecht, London. Springer, pp.17-31.

Dawes, C. (1993). "Considerations in the development of diagnostic tests on saliva." *Ann N Y Acad Sci.* 694, pp. 265-69.

Drake, R., Vogl, A., e Mitchell, A. (2010). *Gray's Anatomia para Estudantes.* São Paulo, Elsevier.

Duffy, M. et al. (2014). uPA and PAI-1 as biomarkers in breast cancer: validated for clinical use in level-of-evidence-1 studies. *Breast Cancer Research.*16, pp. 428.

Eisenberg, A. e Koifman, S. (2001). Câncer de mama: marcadores tumorais (revisão de literatura). *Rev Bras Canc.* 47(4), pp. 377-88.

Gartner, L. e Hiatt, J. (2010). *Atlas Colorido de Histologia*. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan.

Gorodischer, R., et al. (1994). "Saliva versus blood sampling for therapeutic drug monitoring in children: patient and parental preferences and an economic analysis." *Ther Drug Monit.* 16(5), pp. 437-43.

Greabu, M., et al. (2009). "Saliva--a diagnostic window to the body, both in health and in disease." *J Med Life.* 2(2), pp. 124-32.

Haeckel, R. and P. Hanecke (1996). "Application of saliva for drug monitoring. An in vivo model for transmembrane transport." *Eur J Clin Chem Clin Biochem.* 34(3), pp. 171-91.

Harris, L., et al. (2007). "American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer." *J Clin Oncol.* 25(33), pp. 5287-312.

Hoskins, C., Haber, J. e Budin, W. (2001). *Breast Cancer Journey to Recovery*. New York, Springer Publishing Company, Inc.

Hunter, D. J., et al. (2010). "A pathway and approach to biomarker validation and qualification for osteoarthritis clinical trials." *Curr Drug Targets.* 11(5), pp. 536-45.

Inumar, E., et al. (2011). "Fatores de risco e de proteção para câncer de mama: uma revisão sistemática." *Cad. Saúde Pública.* 27(7), pp. 1259-270.

Kaufman, E. e Lamster, I. (2002). "The diagnostic applications of saliva--a review." *Crit Rev Oral Biol Med.* 13(2), pp. 197-12

Laidi, F., et al. (2014). "Salivary expression of soluble HER2 in breast cancer patients with positive and negative HER2 status." *Onco Targets Ther.* 7, pp. 1285-289.

Lawrence, H. P. (2002). "Salivary markers of systemic disease: noninvasive diagnosis of disease and monitoring of general health." *J Can Dent Assoc.* 68(3), pp. 170-74.

Lee, J. M., et al. (2009). "Salivary diagnostics." *Orthod Craniofac Res.* 12(3), pp. 206-11.

Lee, Y. H. and D. T. Wong (2009). "Saliva: an emerging biofluid for early detection of diseases." *Am J Dent.* 22(4), pp. 241-48.

Liga Portuguesa Contra o Cancro. Programa de rastreio de cancro da mama da liga portuguesa contra o cancro. [Em Linha]. Disponível em <<http://www.ligacontracancro.pt/gca/?id=42>>. [Consultado em 28/06/2015]

Lima, D. P., et al. (2010). "Saliva: reflection of the body." *Int J Infect Dis.* 14(3), pp. 184-88.

Llena-Puy, C. (2006). "The role of saliva in maintaining oral health and as an aid to diagnosis." *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 11(5), pp. 449-55.

Malamud, D. (2011). "Saliva as a diagnostic fluid." *Dent Clin North Am.* 55(1), pp. 159-78.

Mahmood, T. and P. C. Yang (2012). "Western blot: technique, theory, and trouble shooting." *N Am J Med Sci.* 4(9), pp. 429-34.

Miller, C. S., et al. (2010). "Current developments in salivary diagnostics." *Biomark Med.* 4(1), pp. 171-89.

Mishra, A. and M. Verma (2010). "Cancer biomarkers: are we ready for the prime time?" *Cancers (Basel).* 2(1), pp. 190-208.

Morgan, J. Gladson, J. e Rau, K. (1998). "Position paper of the american council on science and health on risk factors for breast cancer: established, speculated, and unsupported." *The Breast J.* 4(3), pp.177-97

Navarro, M. A., et al. (1997). "Epidermal growth factor in plasma and saliva of patients with active breast cancer and breast cancer patients in follow-up compared with healthy women." *Breast Cancer Res Treat.* 42(1), pp. 83-86.

Naylor, S. (2003). "Biomarkers: current perspectives and future prospects." *Expert Rev Mol Diagn.* 3(5), pp. 525-529.

Ogbureke, K. and Ogbureke, E. (2015). The History of Salivary Diagnostics. In: Streckfus C. (Ed.). *Advances in Salivary Diagnostics*. New York Dordrecht London. Springer, pp.17-31.

Palanisamy, V. and D. T. Wong (2010). "Transcriptomic analyses of saliva." *Methods Mol Biol.* 666, pp. 43-51.

Patel, S. and Barros, S. (2015). Introduction. In: Streckfus C. (Ed.). *Advances in Salivary Diagnostics*. New York Dordrecht London. Springer, pp.17-31.

Peacock, J. (2002). *Breast Cancer by Judith Peacock*. Mankato, Capstone Press.

Pfaffe, T., et al. (2011). "Diagnostic potential of saliva: current state and future applications." *Clin Chem.* 57(5), pp. 675-87.

Quaranta, M., et al. (2007). "MMP-2, MMP-9, VEGF and CA 15.3 in breast cancer." *Anticancer Res.* 27(5B), pp. 3593-600.

Quebbeman, E. J., et al. (1991). "Risk of blood contamination and injury to operating room personnel." *Ann Surg.* 214(5), pp. 614-20.

Rai, V et al. (2013). "Salivary tumor markers- a review". *Intern Jour Of Pharm, Chem And Bio Scie.* 3(3), pp. 510-20.

Santos, P. et al. (2007). "Saliva: Métodos atuais para Coleta e Obtenção da Amostra". *R Fac Odontol.* 48(1), pp. 95-8.

Santos, L. e Lopes, B. (2014). *Cancro da Mama O que devemos saber? Do diagnóstico ao tratamento*. Lisboa, Lidel.

Segal, A. and D. T. Wong (2008). "Salivary diagnostics: enhancing disease detection and making medicine better." *Eur J Dent Educ.* 12(1), pp. 22-9.

Silva, A. et al. (2015). Salivary Diagnostics, Current Reality and Future Prospects. [Em linha.] Disponível em <<http://www.intechopen.com/books/emerging-trends-in-oral-health-sciences-and-dentistry/salivary-diagnostics-current-reality-and-future-prospects>>. [ Consultado em 03/07/2015].

Streckfus, C., et al. (1999). "CA 15-3 and c-erbB-2 presence in the saliva of women." *Clin Oral Investig.* 3(3), pp. 138-43.

Streckfus, C., et al. (2000a). "A preliminary study of CA15-3, c-erbB-2, epidermal growth factor receptor, cathepsin-D, and p53 in saliva among women with breast carcinoma." *Cancer Invest.* 18(2), pp. 101-09.

Streckfus, C., et al. (2000b). "The presence of soluble c-erbB-2 in saliva and serum among women with breast carcinoma: a preliminary study." *Clin Cancer Res.* 6(6), pp. 2363-370.

Streckfus, C., et al. (2001). "Reliability assessment of soluble c-erbB-2 concentrations in the saliva of healthy women and men." *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 91(2), pp. 174-79.

Streckfus, C. F. and L. R. Bigler (2002). "Saliva as a diagnostic fluid." *Oral Dis.* 8(2), pp. 69-76.

Streckfus, C. et al. (2007). Salivary Biomarkers For the Detection of Cancer. *In: Swenson L. (Ed.). Progress in Tumor Marker Research*. New York. Nova Science Publishers, pp.17-41.

---

Streckfus, C. F., et al. (2012). "Salivary Protein Profiles among HER2/neu-Receptor-Positive and -Negative Breast Cancer Patients: Support for Using Salivary Protein Profiles for Modeling Breast Cancer Progression." *J Oncol* 2012: 413256.

Strimbu, K. and J. A. Tavel (2010). "What are biomarkers?" *Curr Opin HIV AIDS*. 5(6), pp. 463-66.

Sugimoto, M., et al. (2010). "Capillary electrophoresis mass spectrometry-based saliva metabolomics identified oral, breast and pancreatic cancer-specific profiles." *Metabolomics*. 6(1), pp. 78-95.

Slowey, P. (2013). "Commercial saliva collections tools." *J Calif Dent Assoc*. 41(2), pp. 102-05

UCLA School of Dentistry. Point of Care Technology. [Em Linha]. Disponível em <<http://hspp.dent.ucla.edu/about.html>>. [Consultado em 25/06/2015].

UCLA School of Dentistry. Salivary Proteome knowledge Base. [Em Linha]. Disponível em <<http://www.skb.ucla.edu/cgi-bin/spkbcgi-bin/main.cgi>>. [Consultado em 08/06/2015].

Veerman, E. et al. (2008). Processing and Storage of Saliva Samples. In: Wong D. (Ed). *Salivary Diagnostics*. 2121 State Avenue, Ames, Iowa 50014-8300, USA. Wiley-Blackwell, p.73

Vitorino, R., et al. (2004). "Identification of human whole saliva protein components using proteomics." *Proteomics*. 4(4), pp. 1109-115.

Vogell, S. (2014). Chairside Salivary Diagnostics for Oral Diseases. [Em linha.] Disponível em <<http://www.rdhmag.com/articles/print/volume-33/issue-10/features/chairside-salivary-diagnostics-for-oral-diseases.html>>. [Consultado em 06/07/2015].

Wong, D. T. (2012). "Salivary diagnostics." *Oper Dent*. 37(6), pp. 562-70.

Wong, D. T. (2006). "Salivary diagnostics powered by nanotechnologies, proteomics and genomics." *J Am Dent Assoc.* 137(3), pp. 313-21.

Xiau, H. and Wong, D.T. (2011). "Proteomics and its applications for biomarker discovery in human saliva" *Biomed. Informatics.* 5(7), pp. 294-96.

Yamada, N., Yuji R., and Suzuki E. (2009). "The Current Status and Future Prospects of the Salivary Proteome." *J. of Health Sci.* 55(5), pp. 682-88.

Yeh, C. et al. (2010). Current Development of Saliva/Oral fluid-based Diagnostics. *Tex Dent J.* 127(7), pp. 651-61

Yoshizawa, J. M., et al. (2013). "Salivary biomarkers: toward future clinical and diagnostic utilities." *Clin Microbiol Rev.* 26(4), pp. 781-91.

Zhang, L., et al. (2010). "Discovery and preclinical validation of salivary transcriptomic and proteomic biomarkers for the non-invasive detection of breast cancer." *PLoS One.* 5(12), pp. 15573.

## **VI) ANEXOS**