



**Fatores preditivos do agravamento da
insuficiência cardíaca
Biomarcadores salivares em equipamentos Point-
Of-Care**

Sofia Alexandra Lima Silva Costa

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Medicina
(Mestrado Integrado)

Orientador: Prof. Doutor Miguel Castelo Branco Craveiro de Sousa

maio de 2020

Folha em branco

Dedicatória

Completar a nossa educação, principalmente se a mesma passar pelo Ensino Superior, é uma meta que muitos estudantes pelo mundo fora ambicionam. Nem sempre é fácil e há vários fatores que podem levar a desistir. Tive a sorte de me proporcionarem fazer todo um percurso de formação que passou não só por um, mas dois mestrados integrados. Tudo isto não seria certamente possível sem o apoio e suporte que me foi prestado. Aos meus pais tenho por isso que agradecer em primeiro lugar. Proporcionaram-me os meios, o apoio e o amor para que chegasse até aqui e isso é essencial. Ao meu irmão Ricardo, por ter aturado inúmeros queixumes de quão difícil é a vida de estudante ou de trabalhador-estudante e por ter de escrever duas fitas de finalista, agradeço a paciência. Prometo-te que não te vou fazer escrever a terceira. Ao meu namorado Tiago, que me conheceu neste momento da minha vida e que superou a distância, os fins de semana de trabalho, viagens e estudo, para agora nos proporcionar um excelente início de vida a dois. Agradeço-te pelo amor e pela paciência. Acho que estamos preparados para o que a vida nos trouxer. Aos seus pais e família também, que me (nos) apoiou demonstrando o seu orgulho na nossa relação. Não posso encerrar os agradecimentos à família sem agradecer ao nosso mais novo membro, o nosso cão Scotty, que tanta companhia me fez em intermináveis tardes de estudo! Vamos então passar às individualidades. Ao meu orientador, Prof Doutor Miguel Castelo Branco, agradeço a indicação e orientação neste tema (e em todo o percurso deste curso), e nas transformações que ele sofreu, sempre apoiando a continuação deste projeto. À minha (quase) prima Dra Vânia Ribeiro, ainda que de forma informal, me ajudou a delinear as ideias e texto, transmitindo-me o seu conhecimento científico e do terreno como Cardiologista. Às minhas colegas de casa da Covilhã, Renata Costa, Inês Almeida e Inês França, que me aturaram e muita paciência tiveram comigo ao longo deste percurso. Vocês sabem que são especiais. Aos meus amigos que por cá continuaram apesar da distância e do passar dos anos. A todos os colegas, alguns que se tornaram amigos, que me ajudaram, colaboraram e tornaram este percurso que de tão agitado passou muito rápido, e que graças a vocês ficou um pouco mais fácil. A todos os docentes, orientadores de estágio e médicos com que me cruzei, que apoiaram e permitiram de forma direta ou indireta este percurso e este trabalho. Por fim às minhas entidades patronais, colegas e assistentes que me proporcionaram algum sustento financeiro e suporte profissional na minha outra profissão, e também a todas as pessoas que por alguma razão não estão referidas mas que se cruzaram na minha vida e que contribuíram para que estivesse a escrever esta monografia e a terminar de forma bem sucedida um dos meus objetivos.

Folha em branco

Resumo

A Insuficiência Cardíaca é uma doença de prevalência e custos crescentes que tem um grande impacto no orçamento da saúde em Portugal e no mundo. É uma patologia com uma taxa de mortalidade de 50% a 5 anos e cuja progressão é necessário abrandar. Tal só se consegue com uma monitorização apertada da doença que tem de inevitavelmente passar por meios de diagnóstico mais rápidos e eficientes que consigam antever a sua descompensação e fazer um ajuste terapêutico mais eficaz.

Os biomarcadores são, atualmente, meios imprescindíveis de diagnóstico, estadiamento, prognóstico da insuficiência cardíaca e, por isso, muito importantes no seu diagnóstico e gestão. Com a saliva como microfluido de diagnóstico em Point-Of-Care Testing (POCT) esta pesquisa é facilitada, uma vez que este fluido é de fácil obtenção, armazenamento e não necessita de profissionais especializados para a sua recolha. Em ambulatório, cuidados de saúde primários e consulta domiciliar, os Point-Of-Care Testing trazem a possibilidade de medição de biomarcadores em diferentes locais e que até agora só estavam disponíveis por estudo analítico sanguíneo e se pedidos em meio hospitalar. É, portanto, essencial tomar em conta estas novas ferramentas de diagnóstico para que se consiga intervenções diagnósticas e terapêuticas mais precoces a todos os níveis de cuidados de saúde e aumentar a qualidade de vida destes doentes.

Palavras-chave

Saliva; Biomarcadores; Insuficiência Cardíaca; Point-Of-Care Testing; Diagnóstico

Folha em branco

Abstract

Heart failure is a disease of increasing prevalence and represents a big part of health budget in Portugal and worldwide. It is a pathology with a mortality rate of 50% to 5 years and whose progression is necessary to slow down. This can only be achieved with tight monitoring of the disease and that means a more efficient and rapid diagnosis that can prevent its decompensation in order to be able to make therapeutical adjustments more efficiently.

Biomarkers are a really important tool of diagnosis, staging and prognosis of heart failure. Using Saliva as a microfluid in Point-Of-Care Testing (POCT) eases this task, since this fluid is easy to obtain, store and does not require specialized professionals for its collection. In outpatient clinics, primary health care and home consultation, POCT brings the possibility of measuring biomarkers in different places, which until now, was only possible be requested in a hospital laboratory. These reasons made us believe that it is of highest importance to consider these new diagnostic tools in order to achieve earlier diagnostic and therapeutic interventions at all levels of health care and increase the quality of life of these patients.

Keywords

Saliva; biomakers; heart failure; Point of care; Testing; Diagnosis

Folha em branco

Índice

Capítulo 1	1
Secção 1 - Introdução	1
Secção 2 - Metodologia	3
Capítulo 2	4
Secção 1 - A insuficiência cardíaca em Portugal	4
Secção 2 - Biomarcadores na insuficiência cardíaca	5
Secção 3 - Saliva como meio de diagnóstico	7
Secção 4 - Utilidade dos Point-Of-Care	10
Capítulo 3	14
Secção 1 - Discussão	14
Secção 2 - Conclusão	16
Bibliografia	17

Folha em branco

Lista de Figuras

Figura 1- Distribuição dos custos diretos totais devidos à insuficiência cardíaca NYHA II-IV em Portugal Continental (ano de 2014)

Figura 2- Resumo da utilidade dos biomarcadores salivares

Figura 1- Meios de atuação dos POCT

Folha em branco

Lista de Tabelas

Tabela 1- Classes de insuficiência cardíaca segundo a NYHA

Tabela 2- Potenciais biomarcadores da IC

Folha em branco

Lista de Acrónimos

IC	Insuficiência Cardíaca
POCT	Point-Of-Care Testing
BNP	Peptídeo Natriurético do tipo B
NT-proBNP	terminal N do propeptídeo BNP
hs-PCR	Proteína C Reativa de alta sensibilidade
IL-6	Interleucina 6
ST-2	Supressão da tumorigénese -2
IL-10	Interleucina-10
TNF- α	fator de necrose tumoral alfa
EAM	Enfarte Agudo do Miocárdio
ESC	Sociedade Europeia de Cardiologia
TAT	Turnaround Time
DL	Decreto Lei
ISO	Organização Internacional de Normalização

Folha em branco

Capítulo 1

Secção 1

Introdução

A insuficiência cardíaca (IC) é uma patologia altamente incapacitante e cujo tratamento tem um impacto económico significativo. É um problema de saúde pública de proporções epidémicas: atinge cerca de 1-3% da população adulta na Europa e nos Estados Unidos, com um aumento exponencial acima dos 65 anos, chegando aos 5-9%, o que totaliza mais de 37,7 milhões de doentes em todo o mundo. Nos países desenvolvidos, a IC é responsável por 1-4% das hospitalizações, sendo a maior causa de internamentos na Europa e nos Estados Unidos da América dos indivíduos com mais de 65 anos e destes, 25% voltam ao internamento em menos de um mês. ⁽¹⁻³⁾ Assim e apesar dos avanços no diagnóstico e terapêutica, a IC regista uma taxa mortalidade a 5 anos de 50%, que é superior à de alguns tipos de cancro, como o da mama, próstata, cólon e leucemia. ⁽³⁻⁶⁾

Em Portugal e no mundo o peso económico desta patologia é substancial. Representa cerca de 1 a 3% do orçamento global em saúde na Europa, sendo a patologia com maior sobrecarga económica de todas. O custo dos internamentos representa uma grande fatia deste orçamento, cerca de 68%. Em Portugal, os custos globais desta patologia situaram-se num total (custos diretos e indiretos) de 405 milhões de euros em 2014. ^(3, 7)

Em termos fisiopatológicos, a IC caracteriza-se por um aporte insuficiente de sangue aos tecidos devido à perda progressiva da capacidade de bombeamento do coração. ⁽⁸⁾ Existem dois mecanismos cardíacos principais pelos quais isto pode ocorrer: disfunção sistólica, na qual há comprometimento da função contrátil cardíaca; disfunção diastólica, na qual há dificuldade no relaxamento, rigidez ou enchimento cardíaco anormal. Pode ser dividida em insuficiência cardíaca com fração de ejeção reduzida (<40% de fração de ejeção) ou com fração de ejeção preservada (>50% de fração de ejeção). O intervalo entre estes valores considera-se fração de ejeção borderline. ⁽⁹⁾ Há vários fatores de risco para desenvolver IC: doenças cardíacas congénitas ou adquiridas das quais se destaca, pela sua frequência, a doença valvular, a Diabetes Mellitus, hipertensão arterial, Síndrome da Apneia Obstrutiva do Sono, distúrbios do tecido conjuntivo, alcoolismo, cardiomiopatias e infeções víricas. Mais especificamente temos a doença cardíaca isquémica, a doença

valvular e cardiomiopatia dilatada que estão associadas à insuficiência cardíaca com fração de ejeção reduzida e a hipertensão arterial, e também cardiomiopatias restritivas, infiltrativas ou hipertrófica que mais frequentemente se associam a insuficiência cardíaca com fração de ejeção preservada.⁽¹⁰⁾

Para classificar e estadiar a evolução da patologia, a New York Heart Association (NYHA) produziu uma escala de classificação de insuficiência cardíaca relacionada com a sua sintomatologia.

Grau I	Sem limitações da actividade física Actividade física normal não causa fadiga, palpitação ou dispneia.
Grau II	Com ligeiras limitações da actividade física Confortável em repouso, mas a actividade física mais extenuante resulta em fadiga, palpitações ou dispneia.
Grau III	Limitação marcada da actividade física Confortável em repouso, mas actividade física comum causa fadiga, palpitações ou dispneia.
Grau IV	Incapaz de realizar qualquer actividade física sem desconforto. Sintomas de insuficiência cardíaca em repouso. Se alguma actividade física for realizada, o desconforto é aumentado.

Tabela 1- Classes de classificação da IC segundo a NYHA⁽¹¹⁾

A descompensação da insuficiência cardíaca manifesta-se através de variados sintomas, sendo os mais comuns a dispneia, ortopneia, fadiga, tolerância reduzida ao exercício e dor torácica. Sinais clínicos que podem acompanhar estes sintomas são: edemas periféricos, pulso fraco, distensão da veia jugular, terceiro som cardíaco (S3) e crepitações na auscultação pulmonar.^(12, 13)

A insuficiência cardíaca e sua descompensação podem ser avaliadas através de vários fatores preditivos, entre os quais biomarcadores, que podem ser recolhidos através do sangue ou, mais recentemente, da saliva.⁽⁸⁾ Existem várias classes de biomarcadores relacionados com o evento patológico e que se podem tornar fatores preditivos do agravamento da doença. Alguns exemplos são: a inflamação (Proteína C Reativa de alta sensibilidade e a Interleucina-6 (hs-PCR e IL-6)), a tensão miocárdica (peptídeo natriurético B - BNP), remodelação celular (Supressão da tumorigénese -2 (ST2)), fibrose (galactina-3 p.ex.), entre outros.^(14, 15) A Sociedade Europeia de Cardiologia recomenda a análise do peptídeo natriurético do tipo B (BNP) e do terminal N do propeptídeo BNP (NT-proBNP) na avaliação do doente com IC, adicionalmente aos

exames de radiografia de tórax e eletrocardiograma e, com efeito, este é o biomarcador atualmente mais utilizado no estudo desta patologia. ⁽⁵⁾

A utilização de outro tipo de fluidos além do sangue para medição de biomarcadores tem sido progressivamente estudada. A saliva, um dos fluidos mais facilmente obtível, é considerada um ultrafiltrado do plasma (20% a 30% das proteínas do plasma são secretadas na saliva através do fluido crevicular gengival), tem sido considerado como um método promissor na avaliação da IC.^(5, 16, 17) Embora a literatura internacional não seja consensual relativamente à relação de certos biomarcadores salivares com a IC, o NT-proBNP, o cortisol, o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), a interleucina-10 (IL-10), a Proteína Reativa C (PCR) ou ainda a galactina-3 são exemplos de biomarcadores estudados e com aplicação efetiva no diagnóstico e gestão da IC.^(4, 17-19) Por outro lado, apresenta várias vantagens relativamente ao sangue uma vez que a sua colheita é fácil, indolor, não invasiva e mais económica. ^(5, 8, 16, 17, 20-24)

Os meios de diagnóstico Point-Of-Care Testing (POCT) já largamente utilizados em meio hospitalar, são cada vez mais úteis em ambulatório, nos cuidados de saúde primários e na consulta domiciliar, devido à sua portabilidade e possibilidade de avaliação rápida e eficiente de variados parâmetros incluindo biomarcadores. Com o auxílio desta ferramenta poderemos influir no curso da doença, uma vez que, através da obtenção de informação clínica de forma rápida e consistente, o seu diagnóstico, prognóstico e avaliação da progressão ficam facilitados, proporcionando um esclarecimento mais eficiente do paciente e simplificando o fluxo de trabalho. ^(18, 23, 25-27)

Existem vários tipos de POCTs, a maioria baseada em testes sanguíneos para a monitorização de variadas patologias como a Diabetes Mellitus por exemplo.⁽²³⁾ Recentemente, foi criado um POCT que utiliza a saliva e seus biomarcadores para monitorização específica da IC: KardiaTool® que combina a medição de quatro biomarcadores: NT-proBNP, TNF- α , IL-10 e o cortisol.^(18, 25)

Secção 2

Metodologia

Nesta revisão iremos abordar a utilidade do recurso da saliva como meio de medição de vários biomarcadores e a sua utilidade em diagnosticar o agravamento da Insuficiência

cardíaca, bem como a sua medição em equipamentos POC e respetiva utilidade. Para isso recorreremos a artigos pesquisados via “Pubmed”, “Google Scholar”, “Scopus”, “Web of Science” e “Science Direct” com os seguintes termos de pesquisa utilizados: **saliva, biomarkers, heart failure, point-of-care testing, diagnosis**. Utilizámos igualmente a ferramenta “similar articles” e “cited by” disponibilizados no site da “Pubmed”. Foram seleccionados artigos de 2011 a 2020.

Capítulo 2

Secção 1

A insuficiência cardíaca em Portugal

Em Portugal, a IC detém a taxa de mortalidade intra-hospitalar mais elevada de todas as doenças cérebro-cardiovasculares, 12,5%. Isto deve-se a várias razões, nomeadamente à prevalência dos fatores de risco associados: 24% dos portugueses é fumador, 27,5% tem síndrome metabólica e o excesso de peso atinge 53%. Comorbilidades como a Diabetes ou a Hipertensão Arterial atingem uma franja substancial da população com 3 milhões de diabéticos e 42% de hipertensos, a adicionar aos 12 mil Enfartes Agudos do Miocárdio (EAM) que ocorrem em Portugal anualmente.⁽³⁾

A taxa de prevalência global de IC na população com idade superior ou igual a 25 anos em Portugal, estimada para 2014 (com base no estudo EPICA desenvolvido de 1998 a 2000) foi de 5,2%, correspondendo a 383 043 doentes em Portugal, sendo que se considerarmos as classes II a IV da NYHA, que são efetivamente geradoras de custos, temos 3,4% da população afetada, o que perfaz um total de 249.592 doentes.⁽⁷⁾

Os custos diretos com esta patologia são substancialmente elevados, significando cerca de 299 milhões de euros de custos diretos e 106 milhões de euros de custos indiretos (total 405 milhões de euros), valor que corresponde aproximadamente a 0,2% do Produto Interno Bruto e a 2,6% das despesas de saúde anualmente, sendo expectável que estes valores subam para cerca de 503 milhões de euros no total em 2036 fruto do aumento previsto de 27% no número de doentes face ao ano de 2014.⁽⁷⁾

A IC foi responsável em 2014 por 182512 dias de internamento (cerca de 1,9 vezes mais dias do que o EAM). A duração média do internamento por IC foi de 9,8 dias. Assim, e tendo em conta os custos significativos dos Meios Complementares de Diagnóstico e Terapêutica (MCDTS), terapêutica e técnicas cirúrgicas associados à IC obtemos custos de internamento realmente elevados, que se pensam ser ainda maiores do que o SNS reporta.⁽³⁾

A figura 1 sumariza a percentagem de custos totais por rubrica. É de salientar que a maior fração dos custos está associada ao internamento (40%), seguida dos custos com a medicação (24%).⁽⁷⁾

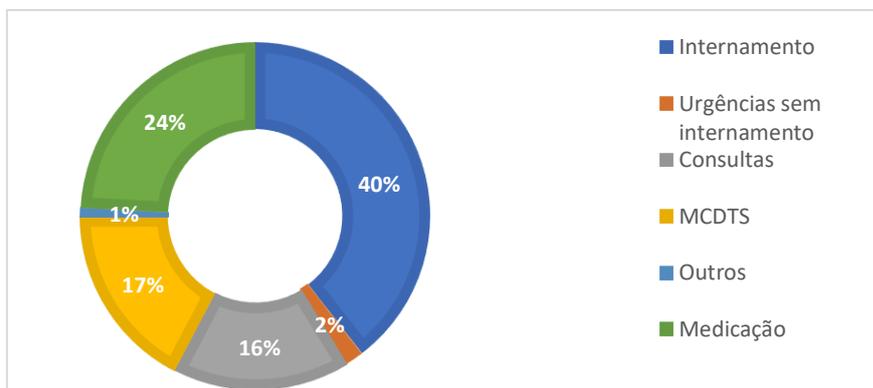


Figura 1 - Distribuição dos custos diretos totais devidos à insuficiência cardíaca NYHA II-IV em Portugal Continental (ano de 2014)⁽⁷⁾

Secção 2

Biomarcadores na insuficiência cardíaca

Um biomarcador pode ser definido como “uma característica que é objetivamente medida e avaliada como um indicador de processos biológicos normais, processos patogénicos ou respostas farmacológicas a uma intervenção terapêutica”.^(9, 28)

Um biomarcador útil deve ser económico e permitir medições repetitivas e precisas com um tempo de processamento rápido. Deve fornecer informações para além das obtidas pela avaliação clínica com um desempenho superior em comparação com outros testes disponíveis e, acima de tudo, deve auxiliar na tomada de decisões e melhorar o cuidado clínico.⁽⁹⁾

Devido à complexidade da síndrome da IC, são necessários mecanismos para complementar as informações estabelecidas a partir da história clínica e do exame físico, daí podermos utilizar os biomarcadores como suporte para estabelecer o diagnóstico. Segundo a Academia Nacional de Bioquímica Clínica (USA), para se estabelecer um novo biomarcador na IC, este deve ser capaz de identificar causas fundamentais da doença, diagnosticar a doença, medir a sua severidade e prever o risco de progressão da doença. Estes biomarcadores podem ser usados para avaliar uma variedade de processos

patofisiológicos que influem na condição clínica de um paciente com IC como fibrose, inflamação, lesão miocárdica e remodelação.^(9, 14) Na tabela 2 resumiram-se potenciais biomarcadores utilizáveis no diagnóstico e gestão da IC.

Mecanismo Patofisiológico	Biomarcador
Stress oxidativo	Ácido úrico, mieloperoxidase
Dano miocárdico	Troponina, Creatina cinase, proteína de ligação a ácidos gordos tipo H
Dano renal	Creatinina, Cistatina C, eletrólitos, lipocaína associada a gelatinase neutrofilica,
Fibrose e remodelação da matriz miocárdica	ST - 2, galactina 3, metaloproteinase da matriz (MMP)
Inflamação	hs-PCR, IL - 6, ST- 2, TNF- α , procalcitonina
Dilatação da câmara/ distensão miocárdica	Peptídeos natriuréticos (BNP/NT-proBNP)
Neuroendócrino	Endotelina 1, Copeptina, proadenomedulina regional

Tabela 1- Potenciais biomarcadores da IC⁽¹⁴⁾

Estes marcadores podem ser utilizados tanto a nível hospitalar, em contexto de urgência ou internamento, como em ambulatório, cuidados de saúde primários ou em consulta domiciliar. São, portanto, uma ferramenta valiosa que nos permite diagnosticar e tratar com mais segurança uma doença que muitas vezes tem sintomatologia inespecífica e cujo curso pode ser de difícil avaliação.^(14, 29)

A Sociedade Europeia de Cardiologia (ESC) recomenda, no diagnóstico inicial de IC, medição de peptídeo natriurético do tipo B (BNP/NT-proBNP) combinada com avaliação clínica.⁽³⁰⁾ O aumento da distensão da parede e a ativação neurohormonal estimulam a libertação de BNP e NT-proBNP que estão associados à disfunção sistólica ventricular esquerda, cujo prognóstico é mais adverso, levando aos sintomas de fadiga progressiva e dispneia que resultam em redução progressiva da tolerância ao exercício. A dispneia na presença de concentrações de BNP \leq 100 pg /mL ou NT-proBNP \leq 300 pg / mL, é indicação para descartar a IC como causa.⁽⁹⁾

Neste momento os biomarcadores mais utilizados na prática clínica são: BNP, NT-proBNP na IC e CRP, cTn-I e cTn-T no EAM. Esses biomarcadores são medidos em laboratório ou através de dispositivos POCT analisando amostras de sangue.⁽³¹⁾

Em Portugal, o doseamento do BNP ou do NT-proBNP não está disponível de forma comparticipada pelo SNS nos cuidados de saúde primários, pelo que, perante sintomas de IC a maioria das vezes inespecíficos, os médicos de família sentem-se inseguros quanto ao diagnóstico, e tal facto leva a que orientem os doentes para a consulta hospitalar de cardiologia. Sendo assim, reveste-se de especial importância dar ferramentas a estes profissionais para que possam diagnosticar a IC e dar o correto acompanhamento a estes pacientes.⁽³⁾

Secção 3

Saliva como meio de diagnóstico

A saliva é produzida por três grandes glândulas salivares (parótida, submandibular e sublingual que produzem 90%) e outras glândulas salivares menores. Tem várias funções entre as quais estão a proteção e a lubrificação da cavidade oral, conferindo proteção contra a cárie, iniciação do processo de digestão através da ação da amílase, e manutenção dos dentes íntegros.⁽³²⁾ É um biofluido que, embora constituído em 99% por água, agrega transudado mucoso, plasma e derivados sanguíneos, células epiteliais, várias secreções (nasais e bronquiais) e uma flora bacteriana variada. Nesta amalgama encontramos hormonas, proteínas, enzimas, anticorpos, constituintes antimicrobianos, DNA, micro-RNA, RNA mensageiro e citocinas, sendo que 20 a 30% deste componentes são idênticos aos do sangue. É, portanto, importante destacar o potencial deste fluido e seus marcadores biológicos no diagnóstico e monitorização da progressão da doença bem como a sua terapêutica.^(17, 20, 24, 33-35)

É considerada um dos microfluidos de eleição num futuro próximo, apresentando várias vantagens relativamente ao sangue uma vez que a sua colheita é fácil, económica, menos invasiva, indolor, não necessita de formação especializada e aporta menos riscos de contaminação quer no momento da colheita quer no transporte ^(5, 8, 16, 20-24, 36) A colheita de sangue pode ser considerada invasiva e desconfortável para os pacientes, ao contrário da saliva que pode ser obtida praticamente sem desconforto e em muito maior número de colheitas que o sangue, sendo que meios alternativos como a urina ou as fezes, embora indolores, não são de obtenção imediata e confortável para o paciente.^(35, 37) O

desenvolvimento de técnicas laboratoriais como “Western Blot”, “Polymerase Chain Reaction” (PCR) ou técnicas imunoenzimáticas (p.e. ELISA), têm proporcionado a análise de fluídos como a saliva.⁽³⁸⁾

No entanto a saliva apresenta também algumas desvantagens: a sua recolha pode estar dificultada em pacientes com xerostomia, comum nos idosos e nos doentes polimedicados. Por ser um fluído de utilização relativamente recente, os métodos de recolha e análise ainda não estão totalmente padronizados para todos os testes podendo resultar em discrepâncias de concentrações. Há também o risco de contaminação por sangue e/ou exsudado inflamatório presente na cavidade oral associado a lesões periodontais.^(17, 33)

Atualmente, o estudo e utilização dos biomarcadores salivares para diagnóstico e monitorização de doenças é bastante abrangente. Há várias patologias e outras aplicações em que estes biomarcadores podem ser úteis (ilustrados na figura 2): doenças autoimunes (Síndrome de Sjögren, Fibrose Quística, p.e.) patologia tumoral, remodelação óssea, marcadores cardiovasculares (IC, EAM), cárie dentária e doenças periodontais, doenças do córtex adrenal, infeções víricas, doença renal, medição hormonal (cortisol, estrogénio, testosterona), controlo de terapêutica farmacológica (epilepsia), evidências forenses, distúrbios genéticos, entre outros.^(17, 38-40)

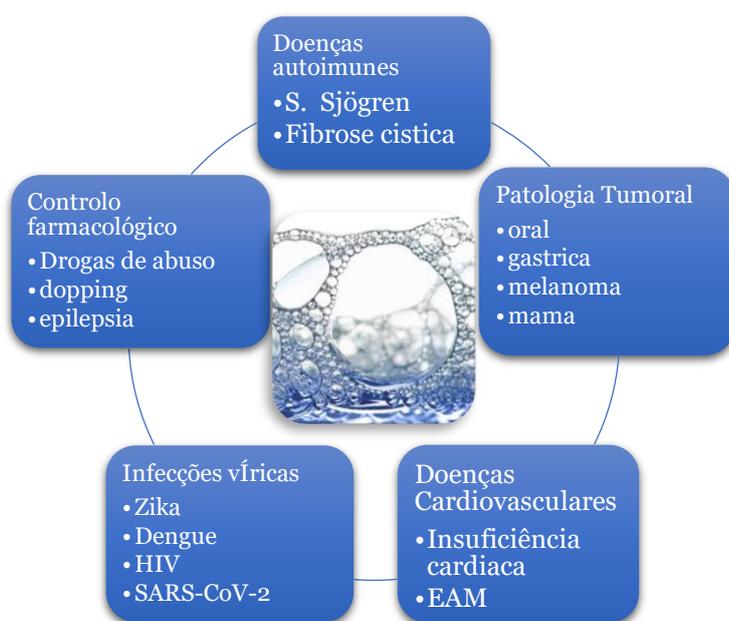


Figura 2: Resumo da utilidade dos biomarcadores salivares^(17, 39, 40)

Na literatura internacional encontramos algumas comparações entre valores de biomarcadores cardiovasculares na saliva e no sangue. Embora os biomarcadores salivares para a IC não sejam totalmente consensuais, uma vez que alguns estudos relatam uma concentração inferior e não significativa para o BNP/NTproBNP e do IL-10^(19, 41), há outros que apresentam concentrações superiores e significativas como é o caso do PCR, IL-6 ou cortisol.^(19, 42) Apesar desta discordância, a relação entre biomarcadores salivares e IC existe, sendo que já foi desenvolvido um POCT para a sua medição: o KardiaToll® que testa o NT-proBNP, cortisol, TNF- α e o IL-10.^(18, 25) Outro biomarcador salivar associado à IC e ao EAM é a PCR e já foi desenvolvido um POCT pela empresa Salimetrics® especificamente para este e que pode ter utilidade em variados outros processos inflamatórios.⁽¹⁷⁾ Há ainda outros biomarcadores que estão a ser estudados especificamente na saliva para monitorizar a IC como é o caso da galactina-3.⁽⁴⁾

Há alguns fatores a ter em conta na recolha e armazenamento da saliva: recolha preferencialmente em jejum uma vez que há hormonas como o cortisol que são dependentes do ciclo circadiano, ou em horas do dia que beneficiem a concentração dos componentes que se deseja analisar; recolha de saliva não estimulada é a preferencial, embora a amostra possa ser pequena, dependendo da idade do paciente e medicação; não é recomendável que haja consumo de alimentos e bebidas bem como higiene oral nas horas que antecedem a recolha e deve-se lavar a boca com água antes da recolha para que não haja resíduos que possam contaminar a amostra. Relativamente ao armazenamento, caso o processamento da amostra não seja feito no local, há várias opções comerciais de tubos de recolha que devem ser armazenados no frio a 4°C para que não diminua a concentração de marcadores como o cortisol. Estas amostras podem ser processadas em 3 a 6 horas após a recolha e conservam-se até 2 semanas a -20°C para medição do cortisol até 3 meses a -80°C.⁽⁴³⁾

Secção 4

Utilidade dos Point-Of-Care

Os equipamentos POCT são unidades de teste laboratorial portáteis, sendo possível testar amostras de fluídos “na cabeceira” ou “perto da cabeceira” do doente, conforme a sua dimensão e contexto de utilização. Com o desenvolvimento da nanotecnologia e microfluídos, houve o desenvolvimento de vários equipamentos POCT, proporcionando-

se o aparecimento de vários testes rápidos, que permitem aos profissionais de saúde tomar decisões terapêuticas mais rápida e eficazmente.^(36, 44, 45) A nível hospitalar os POC são utilizados numa grande variedade de serviços tais como UCI, UCI neonatal, Bloco operatório, Urgência, Unidade de diálise, entre outros.⁽⁴⁵⁾ Os cuidados de saúde em ambulatório, sejam eles cuidados de saúde primários, de especialidade ou de cuidados domiciliários têm especial interesse na utilização destes equipamentos por várias razões: a sua dimensão e portabilidade, permitindo a utilização em diferentes contextos; a diminuição substancial do “Turnaround Time” (TAT) (tempo de processamento da amostra) e conseqüentemente a necessidade de menos tempos de consulta para ajuste terapêutico e limitação da progressão da doença; menor necessidade de pessoal especializado para recolha e processamento de fluidos.^(23, 31, 36, 45) A portabilidade destes equipamentos facilita a consulta domiciliar em meios remotos e envelhecidos bem como nos países subdesenvolvidos.⁽²⁸⁾ A figura 3 resume os vários meios de atuação em que os POCT pode ser inseridos de forma a ultrapassar as restrições de diagnóstico que aí se possam verificar:

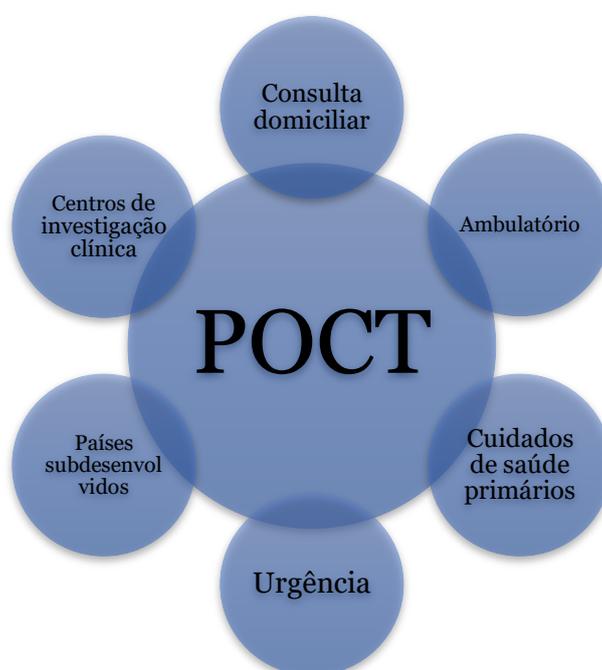


Figura 3- Meios de atuação dos POCT⁽²⁸⁾

Atualmente, os POCTs são utilizados para vários fins: análises de urina, testes e monitorização de glicose no sangue, gasimetrias, coagulação (INR), análise química do sangue, incluindo enzimas e lípidos, drogas de abuso, testes de gravidez, testes de doenças infecciosas, marcadores de doenças cardíacas, hemoglobina e hematócrito.⁽²⁷⁾ São particularmente úteis na monitorização de doenças crónicas que são muitas vezes

silenciosas e necessitam de controlo apertado, como é o caso da Diabetes Mellitus, Hipertensão Arterial, Insuficiência Cardíaca e na prevenção do Acidente Vascular Cerebral.⁽⁴⁶⁾ A importância adquirida por estas tecnologias é de tal forma crescente que podemos verificar um crescimento nos equipamentos tipo POCT, utilizados pelo cidadão comum com variados fins: monitores do sono, balanças com Wi-Fi, pulseiras de medição da pressão arterial, pulseiras e relógios digitais com ligação ao armazenamento online, análises dos resultados por softwares “especializados” e possibilidade de partilha na internet.⁽²⁸⁾ Inclusivamente, com o aparecimento e desenvolvimento dos smartphones, passou a ser possível o armazenamento e transmissão de dados de POCT ligados a estes equipamentos, para vários parâmetros como a medição de tensão arterial, da glicémia, doping e presença de RNA viral do Zika, Dengue, HIV e, mais recentemente, do SARS-CoV-2. Para testes de doping e de infeção viral já existem equipamentos baseados na recolha de saliva que facilitam a sua recolha.^(28, 47-49)

Embora um teste através destes equipamentos tenha um custo maior que num laboratório, há uma poupança significativa nas vantagens que advêm da rapidez do diagnóstico devido à diminuição drástica do TAT e intervenção terapêutica associada.⁽⁴⁵⁾ Com efeito, um controlo mais eficaz da doença significa menos internamentos, menos idas à urgência e menos morbilidade, o que no geral se traduz em menos encargos, pelo que o custo associado aos POCTs se dilui nesta poupança.^(6, 46, 50) Por outro lado, os POCTs permitem uma personalização do tratamento ao avaliar as reais necessidades do paciente naquele momento, ao invés da utilização de uma terapêutica padronizada.⁽²¹⁾

Na gestão de um episódio de descompensação de IC a American Heart Association e o American College of Cardiology recomendam que os resultados de um teste de biomarcadores cardíacos devam estar disponíveis até 1 hora após a colheita, sendo recomendados 30 minutos no caso de EAM. Nestes casos, o POCT revela-se especialmente útil uma vez que consegue estes resultados em 5 a 15 minutos, podendo fazer toda a diferença na gestão destas situações.⁽¹⁵⁾

Os dispositivos POCT devem seguir as chamadas diretrizes ASSURED, definidas pela Organização Mundial da Saúde (OMS), um acrónimo que significa Acessível (Affordable), Sensível (Sensitive), Específico (Specific), Fácil Utilização (User friendly), Rápido e Robusto (Rapid and Robust), Equipamento livre (Equipment free), Entregue (Delivered). Devem, portanto, fornecer informação de forma fácil e rápida ao utilizador final, com o mínimo equipamento necessário, com o mínimo possível de falsos positivos e negativos (especificidade e sensibilidade) sendo ao mesmo tempo seguros e de fácil

utilização. Desta forma e para corresponder a estas diretrizes o design destes equipamentos deve contemplar: interface do operador, dispositivo de entrega de amostras, sistema de identificação de código de barras, armazenamento de reagentes, sensores para medição, sistemas de controle e comunicação, gestão e armazenamento de dados, requisitos de fabrico e célula de reação.⁽³¹⁾

Há várias tecnologias que têm sido utilizadas nos POCT para testar a saliva: Fotometria que contempla biossensores que mudam de cor através de reações químicas, um sistema de imagiologia por quimioluminescência usando a câmara de um smartphone, ou um pequeno equipamento de análise de fluxometria acoplado ao smartphone; Eletroquímica que utiliza as reações ou subprodutos elétricos específicos que resultam de uma reação biológica e os quantifica para fazer uma avaliação do estado biológico; Microfluidos que envolve a manipulação em microescala de fluídos através de microcanais. Este tipo de estudo envolve normalmente outros métodos de deteção que conseguem concentrar e extrair biomarcadores salivares relacionados com doenças.⁽⁴⁰⁾

Estes equipamentos têm vários requisitos de fabrico com normas ISO específicas de fabrico bem como legislação aplicável, através de diretivas europeias que foram vertidas em decretos lei. Na Europa, os dispositivos POCT são regulamentados pela Diretiva Europeia 98/79 / EC de 1998, que entrou em vigor em 2001, sobre aparelhos médicos de diagnóstico *in vitro*, embora esta não faça referência específica aos POCTs. Neste sentido houve várias alterações a esta, as últimas em 2011 (2011/100 / UE). Esta diretiva serviu de base para normas da Organização Internacional de Normalização (ISO). A norma ISO 22870 entrou em vigor em 2006 atribuindo requerimentos específicos aos POCTs e deve ser usada com a norma ISO 15189 que estabelece os requerimentos de competência e qualidade dos laboratórios médicos.⁽⁴⁵⁾ Em Portugal, o Decreto-lei (DL) 189/2000 transpõe a Diretiva 98/79/CE mas, à semelhança desta, não faz referência específica aos POCT. Este decreto já sofreu 5 alterações, a última em 2014. O DL 145/2009 estabelece as regras a que devem obedecer a investigação, o fabrico, a comercialização, a entrada em serviço, a vigilância e a publicidade dos dispositivos médicos e respetivos acessórios e transpõe para a ordem jurídica interna a Diretiva n.º 2007/47/CE, do Parlamento Europeu e do Conselho, de 5 de Setembro. Este DL, à semelhança do anterior, também já sofreu 6 alterações, a última em 2018 (DL 79/2018).⁽⁵¹⁾

Apesar de todas as vantagens que os POCT apresentam, há ainda alguns obstáculos à sua utilização generalizada: dificuldades na utilização (interface, calibração e fontes de referência), custo associado ao teste, responsabilidade acrescida do profissional que

opera o aparelho, a falta de interoperabilidade entre os dispositivos POC e os registros médicos eletrônicos, manutenção do aparelho, discrepância entre resultados laboratoriais e POC e mesmo entre aparelhos.⁽³¹⁾

Para o diagnóstico e gestão da IC já existem algumas opções de POCT para análise sanguínea como é o caso do KardiaTool® que conjuga o NT-pro-BNP, TNF- α , IL-10 e o cortisol.^(18, 25)

Capítulo 3

Secção 1

Discussão

A IC é uma doença de impacto económico significativo em todo o mundo, com prevalência elevada e cuja tendência de crescimento se prevê elevada com o aumento da esperança média de vida e com o aumento da prevalência de comorbilidades associadas como a Hipertensão e a Diabetes Mellitus. É uma patologia grave, com prognóstico desfavorável e com custos significativos, tendo representado um gasto global em Portugal de 409 milhões de euros em 2014 e com perspectiva de aumento de 26% até 2036.^(1, 3, 7) Os seus sintomas são muitas vezes pouco específicos, dificultando o diagnóstico e tratamento pelos médicos de família, que, sem acesso à prescrição de biomarcadores sanguíneos como o BNP e o NT-proBNP, acabam por encaminhar os pacientes para a consulta hospitalar, aumentando o risco de episódios de descompensação.^(3, 12, 13) Isto resulta em mais episódios de urgência, internamento e perda de qualidade de vida à medida que a IC progride. Urge então a necessidade de mudar este paradigma, modificando estratégias de controlo da doença e de diagnóstico precoce, dotando os clínicos dos cuidados de saúde primários de ferramentas para que possam assegurar um diagnóstico e gestão da IC de forma eficiente e segura.⁽³⁾ Aqui a saliva pode desempenhar um papel singular, dada a facilidade de obtenção deste fluido, sem necessidade de pessoal especializado e sua fácil e rápida análise em equipamentos POCT.^(5, 8, 18, 25) Os biomarcadores salivares testados nestes equipamentos podem dar orientações para o diagnóstico da doença de forma mais eficaz dada a sua rapidez de resultados. Se tomarmos o exemplo da consulta domiciliar, tão importante em territórios afastados dos grandes centros urbanos, com população mais envelhecida, com muitas comorbilidades e maior dificuldade de acesso aos serviços de saúde, estes equipamentos revestem-se de especial importância dada a sua facilidade de utilização e portabilidade.⁽²⁸⁾

Os biomarcadores sanguíneos mais utilizados atualmente no diagnóstico da IC são o BNP e o NT-proBNP, estando atualmente em estudo a implementação de outros como a galactina – 3, IL-6, IL-10 por exemplo.^(4, 5) A expressão destes biomarcadores é também verificada na saliva, tendo em conta que a sua composição proteica é 20 a 30% similar

ao sangue.⁽³³⁾ A literatura não é totalmente consensual na concentração e relação com a IC de alguns biomarcadores salivares, nomeadamente o BNP/NT-proBNP.⁽¹⁹⁾ No entanto há relação de vários biomarcadores verificada com a IC que conjugados resultam num meio de diagnóstico mais fiável. Nesse sentido foi desenvolvido um POCT para diagnóstico e gestão da IC o KardiaTool® que conjuga o NT-proBNP, TNF- α , IL-10 e o cortisol.^(18, 25)

O diagnóstico com o auxílio dos POCT apresenta várias vantagens. A diminuição do TAT é um dos principais benefícios, pois permite o teste dos biomarcadores e análise do seu resultado em apenas uma consulta. Este facto, em situações de risco de descompensação da IC, pode fazer toda a diferença, permitindo um ajuste mais eficaz da terapêutica e evitando internamentos. Logo, o custo destes testes, mais elevado que a análise em laboratório, dilui-se na poupança obtida ao evitar os custos associados à descompensação (urgência e internamento por exemplo).^(45, 45) Por outro lado, a sua portabilidade, propriedade distintiva destes dispositivos, é amplamente elogiada em POCT já largamente utilizados como os medidores da glicémia capilar.⁽⁴⁶⁾ De facto, esta característica permite aos profissionais de saúde e aos pacientes a análise de parâmetros de forma imediata onde quer que estejam, seja no hospital, no consultório ou no local onde vive o paciente.⁽²⁸⁾ Estes equipamentos obtiveram, com o surgimento da Internet e dos microsensores, desenvolvimento crescente da sua precisão e portabilidade sendo já possível serem acoplados a um smartphone. ^(44, 47)

Com o desenvolvimento cada vez mais veloz destes aparelhos, poderia surgir a dúvida quanto à sua fiabilidade ou padronização de resultados, no entanto, a sua produção e funcionamento está padronizada através de normas ISO e diretivas comunitárias (vertidas em Decretos Lei), bem como a sua fiscalização, que como dispositivos médicos que são, fica assegurada pelas entidades de saúde competentes (em Portugal, pelo INFARMED). ^(45, 51)

Com tantas vantagens, seria então de esperar que estes dispositivos fossem já largamente utilizados, mas essa não é a realidade na categoria de POCT a que este documento se refere. Por serem recentes e utilizarem um fluído de diagnóstico pouco convencional como a saliva, há ainda algumas barreiras a ultrapassar que se prendem com a necessidade de sensibilização para as vantagens deste fluído e do controlo mais eficaz da IC, bem como formação dos clínicos na utilização destes equipamentos.⁽³¹⁾

Percebe-se então que mais pesquisa sobre este tema é necessária para que os clínicos adquiram confiança neste meio complementar de diagnóstico. São precisos estudos com

amostras mais representativas e padronização de protocolos de recolha e armazenamento da saliva, estabelecimento de “cutoffs” específicos para diagnóstico, estadiamento e prognóstico da IC com base neste fluido e orientações sobre a utilização de POCT baseados na saliva por parte das várias organizações que emanam diretivas de orientação clínica na IC.

Este novo meio complementar de diagnóstico possibilitará uma gestão e intervenção mais atempada da IC, que poderão ser feitas em vários contextos, como os cuidados de saúde primários e a consulta domiciliar, sem a necessidade de que os pacientes se desloquem ao Hospital. Esta vantagem poderá levar ao aumento da qualidade e esperança média de vida dos pacientes bem como minimizar custos significativos que advêm da descompensação e gestão desta patologia.

Secção 2

Conclusão:

Estamos perante um novo advento do controlo analítico na Medicina. As novas tecnologias trouxeram uma extensão da medicina laboratorial ao meio extra-hospitalar estando cada vez mais presente no controlo de um número crescente de patologias. Aliar os POCT a novos fluídos de diagnóstico com a saliva é uma realidade emergente, que é necessário expandir para que as suas vantagens de utilização sejam amplificadas. Para tal é necessária mais pesquisa que corrobore a necessidade da utilização destes meios de diagnóstico e que aumente a confiança dos clínicos. Com estas ferramentas conseguiremos aumentar a esperança de vida, diminuir os custos globais da IC e sua morbidade, mas sobretudo aumentar a qualidade de vida de quem dela padece.

Bibliografia

1. Fonseca C. Comentário a «Epidemiologia da insuficiência cardíaca: prevalência da insuficiência cardíaca e da disfunção ventricular nos idosos ao longo do tempo. Uma revisão sistemática». *Revista Portuguesa de Cardiologia*. 2017;36(5):405-7.
2. Ziaeian B, Fonarow GC. Epidemiology and aetiology of heart failure. *Nat Rev Cardiol*. 2016;13(6):368-78.
3. Pela melhoria do tratamento da insuficiência cardíaca em Portugal – documento de consenso. *Revista Portuguesa de Cardiologia*. 2017;36(1):1-8.
4. Zhang X, Karunathilaka N, Senanayake S, Subramaniam VN, Chan W, Kostner K, et al. The potential prognostic utility of salivary galectin-3 concentrations in heart failure. *Clinical research in cardiology : official journal of the German Cardiac Society*. 2019.
5. Joharimoghadam A, Tajdini M, Bozorgi A. Salivary B-type natriuretic peptide: a new method for heart failure diagnosis and follow-up. *Kardiologia polska*. 2017;75(1):71-7.
6. Christenson ES, Collinson PO, deFilippi CR, Christenson RH. Heart failure biomarkers at point-of-care: current utilization and future potential. *Expert Review of Molecular Diagnostics*. 2014;14(2):185-97.
7. Gouveia MRdA, Ascensão RMSeS, Fiorentino F, Costa JNMPGd, Broeiro-Gonçalves PM, Fonseca MCFGd, et al. Os custos da insuficiência cardíaca em Portugal e a sua evolução previsível com o envelhecimento da população. *Revista Portuguesa de Cardiologia*.
8. Zhang X, Schulz BL, Punyadeera C. The current status of heart failure diagnostic biomarkers. *Expert Rev Mol Diagn*. 2016;16(4):487-500.
9. Sarhene M, Wang Y, Wei J, Huang Y, Li M, Li L, et al. Biomarkers in heart failure: the past, current and future. *Heart Fail Rev*. 2019;24(6):867-903.
10. Tanai E, Frantz S. Pathophysiology of Heart Failure. *Comprehensive Physiology: R. Terjung (Ed.)*. ; 2015. p. 187-214.
11. Classes of Heart Failure 2017 [updated May 2017; cited 2020. Available from: <https://www.heart.org/en/health-topics/heart-failure/what-is-heart-failure/classes-of-heart-failure>.
12. Arrigo M, Jessup M, Mullens W, Reza N, Shah AM, Sliwa K, et al. Acute heart failure. *Nature Reviews Disease Primers*. 2020;6(1):16.
13. Benjamin EJ, Griggs R. C., Wing E. J., Fitz J. G. Andreoli and Carpenter's Cecil Essentials of Medicine. 9th ed: Elsevier; 2016 2016. 1190 p.
14. Spoletini I, Coats AJS, Senni M, Rosano GMC. Monitoring of biomarkers in heart failure. *European Heart Journal Supplements*. 2019;21(Supplement_M):M5-M8.
15. Maisel AS. *Cardiac Biomarkers: Expert Advice for Clinicians*: Jaypee Brothers, Medical Publishers; 2012.
16. Abdul Rehman S, Khurshid Z, Hussain Niazi F, Naseem M, Al Waddani H, Sahibzada H, et al. Role of Salivary Biomarkers in Detection of Cardiovascular Diseases (CVD). *Proteomes*. 2017;5(4):21.
17. Rahim MAA, Rahim ZHA, Ahmad WAW, Hashim OH. Can Saliva Proteins Be Used to Predict the Onset of Acute Myocardial Infarction among High-Risk Patients? *International Journal of Medical Sciences*. 2015;12(4):329-35.
18. Tripoliti EE, Errachid A, Fotiadis DI, Ioannidou P, Toumpaniaris P, Bechlioulis A, et al. KardiaSoft Architecture - A Software Supporting Diagnosis and Therapy Monitoring of Heart Failure Patients Exploiting Saliva Biomarkers. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*. 2019;2019:1382-5.
19. Rebecca LD, Terry AL, Debra KM, Craig SM, Jeffrey LE, Misook LC, et al. Salivary Biomarkers, Oral Inflammation, and Functional Status in Patients With Heart Failure. *Biological Research For Nursing*. 2016;19(2):153-61.

20. Yoshizawa JM, Schafer CA, Schafer JJ, Farrell JJ, Paster BJ, Wong DTW. Salivary biomarkers: toward future clinical and diagnostic utilities. *Clin Microbiol Rev.* 2013;26(4):781-91.
21. Benincasa G, Mansueto G, Napoli C. Fluid-based assays and precision medicine of cardiovascular diseases: the 'hope' for Pandora's box? *Journal of Clinical Pathology.* 2019.
22. Zhang X, Broszczak D, Kostner K, Guppy-Coles KB, Atherton JJ, Punyadeera C. Salivary Protein Panel to Diagnose Systolic Heart Failure. *Biomolecules.* 2019;9(12).
23. Hart R, Mauk M, Liu C, Qiu X, Thompson J, Chen D, et al. Point-of-care oral-based diagnostics. *Oral Diseases.* 2011;17(8):745-52.
24. Punyadeera C. New frontiers in heart failure detection: saliva testing. *BMJ Innovations.* 2016;2(3):106.
25. Tripoliti EE, Karanasiou GS, Ioannidou P, Toumpaniaris P, Goletsis Y, Baussels J, et al., editors. KardiaTool: An Integrated POC Solution for Non-invasive Diagnosis and Therapy Monitoring of Heart Failure Patients. 2018 40th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC); 2018 18-21 July 2018.
26. Kardiatoool <http://www.kardiatoool.eu/> [
27. Khan R, Khurshid Z, Yahya Ibrahim Asiri F. Advancing Point-of-Care (PoC) Testing Using Human Saliva as Liquid Biopsy. *Diagnostics.* 2017;7(3):39.
28. King KR, Grazette LP, Paltoo DN, McDevitt JT, Sia SK, Barrett PM, et al. Point-of-Care Technologies for Precision Cardiovascular Care and Clinical Research. *JACC: Basic to Translational Science.* 2016;1(1-2):73-86.
29. Paul S, Harshaw-Ellis K. Evolving Use of Biomarkers in the Management of Heart Failure. *Cardiology in review.* 2019;27(3):153-9.
30. Taylor KS, Verbakel JY, Feakins BG, Price CP, Perera R, Bankhead C, et al. Diagnostic accuracy of point-of-care natriuretic peptide testing for chronic heart failure in ambulatory care: systematic review and meta-analysis. *BMJ.* 2018:k1450.
31. Tripoliti EE, Fotiadis DI, Ioannidou P, Toumpaniaris P, Rammos A, Pacitto D, et al. Point-of-Care Testing Devices for Heart Failure Analyzing Blood and Saliva Samples. *IEEE reviews in biomedical engineering.* 2020;13:17-31.
32. Silva A, Silva D, Ferreira S, Rodrigues A, Albuquerque A, Marinho S. Salivary Diagnostics, Current Reality and Future Prospects. 2015.
33. Mohamed R, Campbell J-L, Cooper-White J, Dimeski G, Punyadeera C. The impact of saliva collection and processing methods on CRP, IgE, and Myoglobin immunoassays. *Clinical and Translational Medicine.* 2012;1(1):19.
34. Zhang C-Z, Cheng X-Q, Li J-Y, Zhang P, Yi P, Xu X, et al. Saliva in the diagnosis of diseases. *International Journal of Oral Science.* 2016;8(3):133-7.
35. Ilea A, Andrei V, Feurdean C, Băbțan A-M, Petrescu N, Câmpian R, et al. Saliva, a Magic Biofluid Available for Multilevel Assessment and a Mirror of General Health—A Systematic Review. *Biosensors.* 2019;9(1):27.
36. Lei BUW, Prow TW. A review of microsampling techniques and their social impact. *Biomedical Microdevices.* 2019;21(4).
37. Lakshmi K, Nelakurthi H, Kumar A, Rudraraju A. Oral fluid-based biosensors: A novel method for rapid and noninvasive diagnosis. *Indian Journal of Dental Sciences.* 2017;9(1):60-6.
38. Mittal S, Bansal V, Garg S, Atreja G, Bansal S. The diagnostic role of saliva - A Review. *Journal of Clinical and Experimental Dentistry.* 2011;3:e314-e20.
39. Malamud D. Saliva as a Diagnostic Fluid. *Dental Clinics of North America.* 2011;55(1):159-78.
40. Aro K, Wei F, Wong DT, Tu M. Saliva Liquid Biopsy for Point-of-Care Applications. *Frontiers in Public Health.* 2017;5(77).
41. Foo JY, Wan Y, Kostner K, Arivalagan A, Atherton J, Cooper-White J, et al. NT-ProBNP levels in saliva and its clinical relevance to heart failure. *PloS one.* 2012;7(10):e48452.

42. Hammer F, Deutschbein T, Marx A, Gueder G, Michalski R, Ertl G, et al. High evening salivary cortisol is an independent predictor of increased mortality risk in patients with systolic heart failure. *International journal of cardiology*. 2015;203:69-73.
43. Nunes L, Mussavira S, O S B. Clinical and diagnostic utility of saliva as a non-invasive diagnostic fluid: A systematic review. *Biochemia Medica*. 2015;25:177-92.
44. Hu J, Cui X, Gong Y, Xu X, Gao B, Wen T, et al. Portable microfluidic and smartphone-based devices for monitoring of cardiovascular diseases at the point of care. *Biotechnology advances*. 2016;34(3):305-20.
45. Larsson A, Greig-Pylypczuk R, Huisman A. The state of point-of-care testing: a european perspective. *Upsala Journal of Medical Sciences*. 2015;120(1):1-10.
46. Abel G. Current status and future prospects of point-of-care testing around the globe. *Expert Review of Molecular Diagnostics*. 2015;15(7):853-5.
47. Meagher RJ, Kousvelari E. Mobile oral health technologies based on saliva. *Oral Dis*. 2018;24(1-2):194-7.
48. New Rutgers Saliva Test for Coronavirus Gets FDA Approval 2020 [updated 13/04/2020. New Rutgers Saliva Test for Coronavirus Gets FDA Approval]. Available from: <https://www.rutgers.edu/news/new-rutgers-saliva-test-coronavirus-gets-fda-approval>.
49. Mittal S, Bansal V, Garg SK, Atreja G, Bansal S. The diagnostic role of saliva: a review. 2011.
50. Goble JA, Rocafort PT. Point-of-Care Testing: Future of Chronic Disease State Management? *Journal of Pharmacy Practice*. 2015;30(2):229-37.
51. Cardoso ALL. DISPOSITIVOS MÉDICOS PARA DIAGNÓSTICO IN VITRO - IMPACTO OPERACIONAL, CLÍNICO E ECONÓMICO DA SUA UTILIZAÇÃO EM INSTITUIÇÕES DE SAÚDE. Lisboa: Universidade Nova de Lisboa; 2012.