



UNIVERSIDADE CATÓLICA PORTUGUESA

CENTRO REGIONAL DAS BEIRAS

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

*ESTUDO IN SILICO DE MECANISMOS MOLECULARES DA
COAGULAÇÃO/FIBRINÓLISE ENVOLVIDOS NO PROCESSO DE
CICATRIZAÇÃO NA DIABETES MELLITUS TIPO 2 – IMPLICAÇÕES NA
SAÚDE ORAL*

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

Por

Diana Isabel Amaral

Setembro de 2011



UNIVERSIDADE CATÓLICA PORTUGUESA

CENTRO REGIONAL DAS BEIRAS

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

*ESTUDO IN SILICO DE MECANISMOS MOLECULARES DA
COAGULAÇÃO/FIBRINÓLISE ENVOLVIDOS NO PROCESSO DE
CICATRIZAÇÃO NA DIABETES MELLITUS TIPO 2 – IMPLICAÇÕES NA
SAÚDE ORAL*

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

Orientador: Professora Doutora Marlene Barros

Co-orientador: Mestre Nuno Rosa

Por

Diana Isabel Amaral

Setembro de 2011

Aos meus pais,
porque é a eles que devo tudo, obrigada pelo constante apoio, preocupação e amor.

Ao Ricardo,
pelo apoio durante a elaboração deste trabalho e por tudo o que representa para mim.

À minha avó,
pelo carinho e afecto.

Agradecimentos

À Professora Doutora Marlene Barros,

pelo incentivo, apoio e disponibilidade demonstrada em todas as fases que levaram à concretização deste trabalho, transmitindo-me os melhores e mais úteis ensinamentos.

Ao Professor Doutor Jorge Leitão,

pelo interesse e apoio que demonstrou relativamente à realização deste trabalho, e pela partilha da sua experiência e sabedoria.

Ao Mestre Nuno Rosa,

pela sua disponibilidade e ajuda sempre tão atempada em momentos mais complicados durante a elaboração deste trabalho.

À Professora Doutora Maria José Correia,

pelos comentários, sugestões e incentivo.

À minha amiga e colega Ana Bessa,

pela amizade e apoio incondicional, e pela convivência única ao longo destes 5 anos.

Aos amigos que fiz ao longo destes anos na Faculdade,

que os tornaram numa das melhores fases da minha vida.

Resumo:

Com o desenvolvimento da investigação biomédica e de novas metodologias da Proteómica, foi possível identificar a totalidade de proteínas presentes em células individuais, tecidos e órgãos e relacionar com algumas patologias as alterações destas proteínas nomeadamente a sua presença, ausência, modificações pós-tradução ou quantidade expressa. Para analisar o elevado número de proteínas identificadas em proteomas é necessário recorrer à utilização de ferramentas bioinformáticas para que seja possível integrar a informação obtida e comparar com a informação disponível em diferentes bases de dados. As abordagens referidas são hoje um contributo decisivo para o esclarecimento de mecanismos moleculares e fisiopatológicos.

A Diabetes mellitus tipo 2 (DMT2), por ser uma patologia de etiologia multifactorial prevalente e com implicações relevantes na cavidade oral, principalmente pela dificuldade acrescida de cicatrização, constitui-se como um bom modelo de estudo para a aplicação da Bioinformática Médica à Medicina Dentária.

O presente trabalho é dedicado à análise dos proteoma salivar resultante da DMT2 no sentido de verificar a presença, na saliva, de proteínas alteradas envolvidas na coagulação sanguínea e fibrinólise, dois acontecimentos celulares determinantes para o processo de cicatrização o qual se encontra comprometido no paciente diabético. Esta análise do proteoma salivar é particularmente relevante pois, actualmente, não existem estudos publicados referentes à participação de proteínas da saliva que justifiquem a hipercoagulação e hipofibrinólise que ocorre na DMT2.

O estudo do proteoma salivar da DMT2 permitiu a identificação de dois inibidores importantes de proteases serínicas, alfa-1-antitripsina (SERPINA1) e alfa-2-macroglobulina (A2M), que se encontram alterados na saliva do paciente diabético. Como estes inibidores desempenham um papel regulador decisivo na coagulação/fibrinólise e estando ambos presentes mas em quantidades alteradas, poderão constituir uma das principais causas para a dificuldade de cicatrização.

A presença na saliva de proteínas envolvidas na coagulação/fibrinólise mostra que este fluído biológico pode constituir um possível meio auxiliar para o diagnóstico da patologia. Os resultados obtidos provam o potencial dos estudos *in silico* permitindo, a partir da análise do proteoma salivar, estabelecer novos alvos para futuros estudos experimentais e identificação de potenciais biomarcadores salivares, visando a intervenção terapêutica, clínica ou de diagnóstico da DMT2.

Palavras-chave: Diabetes mellitus tipo 2; Proteoma Salivar; Bioinformática; Coagulação sanguínea; Fibrinólise; SERPINA1; A2M

Abstract:

With the development of biomedical research and new Proteomics methodologies, it was possible to identify all the proteins found in individual cells, tissues and organs and link the changes of these proteins with some pathologies, including the presence, absence, post-translational modifications or expressed quantity. To analyze the large number of proteins identified in proteomes is necessary the use of bioinformatic tools to be able to integrate the information obtained and compare with information available at different databases. These approaches are nowadays a decisive contribution to the clarification of molecular and pathophysiological mechanisms.

Type 2 Diabetes mellitus (T2DM) is a prevalent disease of multifactorial etiology with important implications in the oral cavity, mainly by the increased difficulties in wound healing in diabetic patients. With these characteristics it becomes a good study model for Medic Bioinformatics application to Dental Medicine.

The present work is dedicated to the analysis of the salivary proteome resulting from T2DM to verify the presence in saliva, of modified proteins involved in blood clotting and fibrinolysis, two cellular events that are crucial to the healing process. This salivary proteome analysis is particularly relevant because, nowadays, there are no published studies about the participation of salivary proteins that justifies the hypercoagulation and hypofibrinolysis occurring in T2DM.

The study of T2DM salivary proteome allowed the identification of two major inhibitors of serine proteases, alpha-1-antitrypsin (SERPINA1) and alpha-2-macroglobulin (A2M), modified in T2DM. As these inhibitors play a crucial regulatory role in coagulation/fibrinolysis being both present in altered quantities in T2DM possibly causing poor wound healing.

The presence, in saliva, of proteins involved in coagulation/fibrinolysis shows that this biological fluid may be a diagnosis aid. The results obtained show the potential of *in silico* studies of the salivary proteome, to provide new targets for future experimental studies and a possible identification of salivary biomarkers, aiming at the therapeutic, clinical or diagnostic intervention in T2DM.

Keywords: Type 2 Diabetes mellitus; Salivary Proteome; Bioinformatics; Blood clotting; Fibrinolysis; SERPINA1; A2M;

Índice

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Diabetes mellitus tipo 2	1
1.1.1 Conceito e Epidemiologia	1
1.1.2 Factores de risco	2
1.2 Coagulação sanguínea no paciente com DMT2	3
1.2.1 Função endotelial no processo de coagulação sanguínea	3
1.2.2 Função plaquetária no processo de coagulação sanguínea	7
1.2.3 Cascata da coagulação e fibrinólise	8
1.3 Factores de regulação da cascata da coagulação.....	12
1.3.1 Inibidores de proteases serínicas da cascata da coagulação	12
1.4 Processo de cicatrização no paciente com DMT2	15
1.5 Complicações orais da DMT2	20
1.5.1 Dificuldades no processo de cicatrização	20
1.5.2 Alterações das glândulas salivares e da saliva.....	20
1.5.3 Maior tendência para infecções orais	22
1.5.4 Maior predisposição à Doença Periodontal.....	23
1.6 Diagnóstico da DMT2	25
1.7 A Proteómica e a Bioinformática no estudo da DMT2.....	27
2. OBJECTIVOS	29
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	31
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
4.1 Pesquisa do proteoma salivar da DMT2	35
4.2 Determinação das fontes de produção das proteínas salivares alteradas na DMT2	35
4.3 Vias de sinalização em que participam as proteínas salivares alteradas na DMT2	38

4.4	Avaliação das funções moleculares em que participam as proteínas salivares alteradas na DMT2	39
4.5	Identificação das vias de sinalização em que estão implicadas as proteínas salivares alteradas com função de regulação enzimática e de ligação	41
4.6	Estudo das proteínas salivares alteradas na DMT2 implicadas na via da coagulação sanguínea	42
4.7	Glicosilação não enzimática de inibidores de proteases serínicas	46
4.8	Dissolução do coágulo de fibrina na DMT2	49
5.	CONCLUSÃO.....	53
6.	BIBLIOGRAFIA.....	55
7.	ANEXOS.....	61
7.1	Índice de figuras.....	61
7.2	Índice de tabelas.....	61
7.3	Índice de abreviaturas	62

*ESTUDO IN SILICO DE MECANISMOS MOLECULARES DA
COAGULAÇÃO/FIBRINÓLISE ENVOLVIDOS NO PROCESSO DE
CICATRIZAÇÃO NA DIABETES MELLITUS TIPO 2 – IMPLICAÇÕES NA
SAÚDE ORAL*

1. Introdução

1.1 Diabetes mellitus tipo 2

1.1.1 Conceito e Epidemiologia

A Diabetes mellitus (DM) engloba um grupo de distúrbios metabólicos comuns que compartilham o fenótipo de hiperglicemia. Os factores que contribuem para este aumento da glicose no sangue podem incluir redução da secreção de insulina, diminuição da sua utilização e aumento de glicose. Existem tipos distintos de Diabetes, causados por uma interacção entre factores genéticos, ambientais e de estilo de vida. São classificados segundo o processo patogénico que origina a hiperglicemia, não sendo, actualmente, considerados como critérios a idade de apresentação ou o tipo de tratamento. As duas categorias gerais da Diabetes são designadas como tipos 1 e 2, existindo também a Diabetes mellitus gestacional e uma categoria que engloba outros tipos específicos de DM (Kasper *et al* 2005).

Aproximadamente 85-90% dos indivíduos com DM pertencem à classificação tipo 2 (Skamagas *et al* 2008). Dado o aumento exponencial do número de casos de Diabetes mellitus tipo 2 (DMT2), a investigação biomédica enfrenta grandes desafios, particularmente na compreensão da patogénese desta doença e descoberta de biomarcadores para o diagnóstico da doença (Li *et al* 2008). De acordo com as estimativas da Organização Mundial de Saúde em 2000, existiam 171 milhões de pessoas em todo o mundo com Diabetes. A Diabetes mellitus diminui a esperança média de vida: uma pessoa diagnosticada com a patologia aos 40 anos terá uma diminuição da esperança de vida de cerca de 12 anos nos homens e 14 anos nas mulheres (Skamagas *et al* 2008). Cinco por cento das mortes a nível mundial estão atribuídas à Diabetes.

A Diabetes mellitus tem tido uma incidência mundial crescente, sendo apontada como uma das principais causas de morbidade e mortalidade no futuro próximo. Apesar da prevalência dos tipos 1 e 2 se encontrar em aumento em todo o mundo,

espera-se que o predomínio da DMT2 tenha um crescimento mais rápido devido ao número crescente da população obesa e da diminuição de actividade física.

1.1.2 Factores de risco

A pluralidade de factores de risco, alguns modificáveis e outros fixos, predis põem o indivíduo a desenvolver DM. História da doença em familiares de primeiro grau, o avanço da idade e a etnia (Hispânicos, Afro-americanos, Asiático-americanos, nativo-americanos) são factores clássicos de risco não-modificáveis. Obesidade e IMC > 25 kg/m², sedentarismo e uma homeostase da glicose comprometida, pré-existente, são factores de risco modificáveis. Outros factores, incluem a Diabetes mellitus gestacional, antes do parto de um bebé com peso > 4kg, síndrome dos ovários poliquísticos, hipertensão e dislipidémia (trigliceridémia ou baixo colesterol HDL) (Skamagas *et al* 2008).

Diversos estudos demonstraram uma associação entre a obesidade e a DMT2 (Saito *et al* 2007). A obesidade é um factor de risco para a DMT2 por estar associada à hiperinsulinémia e resistência à insulina. Igualmente importante como factor de risco da Diabetes é a localização da gordura, considerando-se a medida do perímetro abdominal o indicador mais fiável das alterações metabólicas verificadas nos obesos (Golay *et al* 2005).

A dieta é também considerada como um factor de risco relevante para a Diabetes, em especial quando existe elevado consumo de gorduras saturadas e de hidratos de carbono, ingestão de poucas fibras e uma substituição dos alimentos tradicionais por alimentos pré-fabricados e hipercalóricos (Golay *et al* 2005).

1.2 Coagulação sanguínea no paciente com DMT2

A DMT2 é uma condição caracterizada por um ambiente metabólico e funcional que promove o desenvolvimento de processos ateroscleróticos e as suas conseqüentes complicações macrovasculares, como enfarte agudo do miocárdio, acidente vascular cerebral e patologia arterial periférica. Existe uma tendência pró-trombótica devido a vários processos que se encontram afectados pela hiperglicemia e resistência à insulina, nomeadamente a cascata da coagulação, a função endotelial, a adesividade plaquetária, a adesividade de monócitos, a função dos macrófagos e a fibrinólise (Mafrici *et al* 2010).

Para compreender melhor esta predisposição pró-trombótica multifactorial no paciente diabético, serão abordados os aspectos fundamentais responsáveis por esta condição: disfunção endotelial, hiper-reatividade plaquetária, alteração do mecanismo de coagulação sanguínea (hipercoagulação) associada a uma capacidade reduzida de fibrinólise.

1.2.1 Função endotelial no processo de coagulação sanguínea

O endotélio vascular produz várias moléculas e mediadores, cuja importância é fundamental para a manutenção da homeostasia vascular, modulação do fluxo sanguíneo, activação plaquetária e da cascata de coagulação e resposta a um estímulo inflamatório crónico (Rask-Madsen *et al* 2007). Quando o endotélio se encontra intacto e sem exposição a substâncias tóxicas, existe uma predominância dos efeitos de protecção (anti-aterogénica) mediada pela acção do óxido nítrico (NO) (Devaraj *et al* 2005). Na presença de um endotélio danificado ou exposto a substâncias tóxicas endógenas (p.ex, LDL oxidada), ou no caso de condições patológicas como a DMT2 que favorecem o aumento dos níveis circulantes dessas substâncias, prevalecem os efeitos induzidos pela produção de endotelina, prostaglandinas, citocinas e quimiocinas. Estes mediadores favorecem a vasoconstrição, a proliferação e migração de fibrocélulas do músculo liso e de células inflamatórias, a adesão e agregação plaquetária, a activação de factores de coagulação, a neoangiogénese, a produção de inibidor do activador de plasminogénio do tipo 1 (PAI-1) e da angiotensina II (Rask-Madsen *et al* 2007).

No paciente com DMT2, observa-se um grau variável de disfunção endotelial que é independente da presença de placa aterosclerótica. Esta disfunção tem origem em três mecanismos patogénicos: a resistência à insulina, um estado inflamatório crónico e hiperglicemia plasmática.

Na resistência à insulina, a libertação de ácidos gordos por parte do tecido adiposo está aumentada, determinando um estado de hiperlipidémia que caracteriza a DMT2 (aumento do LDL e diminuição do HDL) (Jansson 2007). O aumento da oxidação de ácidos gordos circulantes leva a um aumento da produção de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) e flavina adenina dinucleotídeo (FADH₂), que, saturando a capacidade de transporte da cadeia mitocondrial, induz uma produção aumentada de ião superóxido, o que causa o dano endotelial (Brownlee 2005).

No paciente diabético, o tecido adiposo produz uma notável quantidade de citocinas como o factor de necrose tumoral alfa (TNF- α) e a interleucina 6 (IL-6) (que levam a uma activação inflamatória), de adipocina, leptina, resistina e PAI-1 (substâncias de efeito pró-coagulante aterogénico) e uma produção reduzida da citocina adiponectina (de acção vasodilatadora e antiaterogénica) (Bansilal *et al* 2007). O espectro da resposta endotelial causada pela acção desses mediadores é muito amplo, nomeadamente maior permeabilidade vascular, resposta vasomotora alterada, adesão leucocitária aumentada e maior facilidade de formação do trombo através da secreção de substâncias pró-coagulantes, inibição do mecanismo anticoagulante e comprometimento da actividade fibrinolítica espontânea mediada pela estimulação da produção do PAI-1, como já foi referido (Hartge *et al* 2007).

A activação da via de sinalização do factor nuclear kappa B (NF- κ B) pelo TNF- α , da IL-6, da angiotensina II, da insulina, do LDL oxidado e da hiperglicémia, induz a expressão de genes que originam um aumento da produção de molécula de adesão celular vascular 1 (VCAM-1), E-selectina, molécula de adesão inter-celular, IL-1, IL-6, IL-8, factor tecidual, PAI-1, e uma redução na expressão da sintase endotelial do óxido nítrico (eNOS) que intervém no mecanismo de mobilização, adesão e proliferação celular, factores que aumentam a trombogenicidade (Jansson 2007).

O transporte da glucose ocorre por difusão facilitada (insulino-independente) tanto em células musculares lisas como em células endoteliais no entanto, nestas últimas, o aumento da concentração de glucose no sangue favorece o acúmulo de metabólitos o que leva a um aumento do stress oxidativo (Schalkwijk *et al* 2005).

Em condições normais, a glucose é metabolizada através da via glicolítica. Quando ocorre um aumento da sua concentração intracelular (hiperglicemia) são activadas três vias metabólicas (via do poliol, via da hexosamina, via do diacilglicerol) que levam a um aumento do stress oxidativo induzindo disfunção endotelial (Schalkwijk *et al* 2005):

1. A via do poliol: com acumulação de sorbitol dentro da célula que leva a um aumento do stress osmótico; o aumento de citosol da relação NADH/NAD⁺ provoca um desequilíbrio oxidativo similar àquele que se encontra no estado de hipoxia celular (pseudo-hipóxia hiperglicémica) que favorece a acumulação de trifosfatos que, por sua vez, aumenta a formação de produtos finais de glicosilação avançada (AGE) e o stress oxidativo;
2. A via da hexosamina: com o aumento da frutosamina-6-fosfato cujos níveis elevados junto com os de N-acetil-glucosamina, aumenta a glicosilação dos factores de transcrição SP-1, levando a um aumento da produção do inibidor PAI-1 e do factor transformador de crescimento 1 (TGF- β 1) que regula a diferenciação e apoptose celular, a síntese de colagénio e a produção de factor de crescimento do endotélio vascular (VEGF);
3. A via da proteína cinase C (PKC): induz o aumento dos níveis de diacilglicerol, que regula a actividade da NADPH-oxidase e é responsável pela produção aumentada do ião superóxido a nível da parede vascular, amplificando o stress oxidativo. É também de salientar que a PKC exerce uma acção moduladora na expressão genética de outras substâncias, tais como eNOS, VEGF, TGF- β , o PAI-1 e NF- κ B envolvidos em processos celulares de proliferação, inflamatórios e pró-trombóticos (Brownlee 2005).

Devemos considerar também que o aumento dos níveis de glicólise determina dois processos importantes (Schalkwijk *et al* 2005):

1. A hiper-produção de intermediários dicarbonílicos que induzem uma glicosilação não enzimática de proteínas, levando à formação de AGE

que actuam aumentando o stress oxidativo e activando mecanismos inflamatórios e pró-trombóticos.

2. A produção aumentada de equivalentes redutores a partir do ciclo do ácido cítrico (através da hiper-produção de piruvato) que determina, a nível mitocondrial, uma hiper-produção do ião super-óxido que, gerando radicais hidroxila, leva a uma redução da actividade da eNOS. O ião superóxido também causa a inibição da desidrogenase do gliceraldeído 3-fosfato através da activação da poli ADP-ribose polimerase (PARP) e provoca o acúmulo de produtos intermediários da glicólise que são metabolizados, amplificando a lesão endotelial.

A alteração da função endotelial está ainda relacionada com o ião reactivo do oxigénio que é capaz de inactivar directamente o NO e gerar peroxinitrito que, por sua vez, inactiva a eNOS causando peroxidação lipídica (que induz disfunção endotelial) e reduz a actividade da sintetase da prostaciclina, levando ao aumento da expressão endotelial das moléculas de adesão e da apoptose (Schalkwijk *et al* 2005).

No paciente com DMT2, existe uma produção diminuída de óxido nítrico, seja por inibição multifactorial da eNOS, seja pela inactivação aumentada por parte de substâncias de espécie reactiva do oxigénio, expressão do stress oxidativo que caracteriza o metabolismo celular do paciente diabético que contribui para a produção de AGE, activação da PKC e da cascata das MAPK que conduzem à produção de vários factores de transcrição e conseqüente aumento da produção de proteínas de sinalização celular (Brownlee 2005). Além disso, o endotélio do paciente diabético também produz uma menor quantidade de trombomodulina (proteína ligada ao sistema anticoagulante da proteína C) e uma maior quantidade de factor tecidual (factor que activa a via extrínseca da cascata da coagulação) e de diversas MMPs (Mafriqi *et al* 2010).

Estudos *in vitro* demonstram que quando as células endoteliais são expostas a níveis elevados de glucose, aumentam a produção de componentes da matriz extracelular (colagénio e fibronectina), de proteínas pró-coagulantes (factor de von Willebrand- vWF e factor tecidual), diminuem a capacidade de proliferação e migração, a capacidade fibrinolítica torna-se reduzida e ocorre um aumento da apoptose (Schalkwijk *et al* 2005).

1.2.2 Função plaquetária no processo de coagulação sanguínea

Sabe-se que as plaquetas, em virtude das suas características funcionais (libertação de substâncias que interagem com o endotélio, com outras células hemáticas e com factores de coagulação), são elementos chave no processo de reparação de danos vasculares e no processo de formação do trombo (Sobel *et al*, 2004).

Diferentes substâncias como adrenalina, serotonina, trombina e tromboxano, são capazes de activar e provocar libertação de factores pró-coagulantes, pró-inflamatórios e mitogénicos (necessários para a reparação de danos endoteliais, promovendo a expressão de receptores glicoprotéicos da membrana, e para a formação da ponte de fibrinogénio) e de sensibilização das plaquetas para a acção dos antagonistas (Fadini *et al* 2005). A disfunção endotelial provoca uma activação local das plaquetas que amplificam a resposta inflamatória local, favorecendo, por sua vez, o estabelecimento de um estado pró-trombótico.

Estudos *in vitro* demonstram que o NO e a prostaglandina endotelial I₂ inibem a actividade plaquetária mediante a activação de vários mediadores, incluindo a fosfoproteína estimulada por vasodilatação (VASP) que intervém na sequência de activação e agregação plaquetária, modulando a interacção dos filamentos de actina e inibindo a ligação do fibrinogénio ao receptor da glicoproteína (GP) IIb/IIIa (Schafer *et al* 2008). Em particular, a activação da VASP é regulada pelo receptor P2Y₁₂ que, pelo aumento da concentração intra-celular de AMP cíclico, induz a fosforilação da proteína que determina a inactivação e, conseqüentemente, a reactividade plaquetária (Angiolillo *et al* 2008).

A via de sinalização do receptor P2Y₁₂ é normalmente inibida pela acção da insulina sobre as plaquetas. Em condição de resistência à insulina, existe um aumento do sinal mediado por este receptor, o que explica a maior reactividade plaquetária em pacientes diabéticos (Angiolillo *et al* 2008).

As plaquetas do paciente diabético possuem maiores dimensões do que o normal, seja por uma disfunção dos megacariócitos (talvez devido à acção da insulina), seja por uma activação crónica do stress. Além disso, existe uma maior libertação de factor plaquetário 4 (inibidor da heparina), de β-tromboglobulina, tromboxano A₂ (potente vasoconstritor), PAI-1, fibrinogénio, vWF, factores de crescimento como VEGF, TGF-β e factor de crescimento derivado de plaquetas (Stratmann *et al* 2005).

Estudos *in vitro* comprovam que as plaquetas do paciente diabético aumentam 3 a 7 vezes a produção de factor X activado e de trombina, enquanto que as suas membranas apresentam uma reduzida fluidez da componente lipídica o que determina a exposição de um maior número de receptores plaquetários de glicoproteína (GP) com uma afinidade aumentada pelo fibrinogénio (Stratmann *et al* 2005). De um ponto de vista funcional, as plaquetas do paciente com DMT2 apresentam uma maior adesividade e uma tendência aumentada para agregação espontânea. Para explicar esta hiper-actividade das plaquetas têm sido sugeridas várias hipóteses: a mais aceite envolve a glicosilação não enzimática dos receptores GP juntamente com a reduzida fluidez da membrana plaquetária; é também possível que a presença de imunocomplexos de insulina contribuam para potenciar esse mecanismo (Winocour *et al* 1992). Alguns autores demonstraram que a activação de plaquetas favorece o aumento da produção de vWF e do factor VIII que, por um mecanismo de *feedback*, aumentam ainda mais a sua activação; a concentração destes elementos é condicionada pela resistência à insulina, o que afecta a adesão e activação plaquetária o que se associa a um aumento do PAI-1 (Stratmann *et al* 2005).

Por fim, parece que as plaquetas dos pacientes com DMT2 possuem uma menor sensibilidade à acção da insulina devido a um reduzido número de receptores específicos que, no indivíduo normal, são capazes de reduzir a resposta dos agonistas (ADP, colagénio, trombina, prostaglandina) que induzem uma regulação negativa do receptor plaquetário α_2 -adrenérgico, limitando assim a resposta pró-agregante da catecolamina (Stratmann *et al* 2005).

1.2.3 Cascata da coagulação e fibrinólise

Em condições normais, o sistema de coagulação é caracterizado por um constante equilíbrio entre os processos de coagulação e fibrinólise, representados de forma resumida na Figura 1, graças ao facto de todos os factores estarem presentes em forma inactiva e os inibidores encontrarem-se activos.

A cascata de coagulação, que favorece a formação do coágulo, é iniciada quando ocorre lesão endotelial, levando à exposição de colagénio e produção de factor tecidual e factor VIIa (FVIIa). Ocorre a conversão de protrombina em trombina pelo

complexo protrombinase (FXa e FVa) e, subsequentemente, a formação de fibrina, a partir do fibrinogénio, e agregação de plaquetas que resulta na formação do trombo/coágulo. O coágulo de fibrina é estabilizado e tornado mais resistente pelo FXIII, que também é activado pela trombina (Grant 2007).

A fibrinólise mediada por plasmina, que resulta em produtos de degradação da fibrina e lise do coágulo, ocorre seguidamente à conversão de plasminogénio em plasmina pelo activador tecidual do plasminogénio (tPA). O inibidor do activador do plasminogénio do tipo 1 (PAI-1) inibe rapidamente o tPA, e a α -2-antiplasmina (α -1-AP) inactiva a plasmina. O inibidor da fibrinólise activado pela trombina (TAFI) leva à clivagem da fibrina de modo a prevenir a co-activação do plasminogénio pela fibrina.

a The coagulation cascade

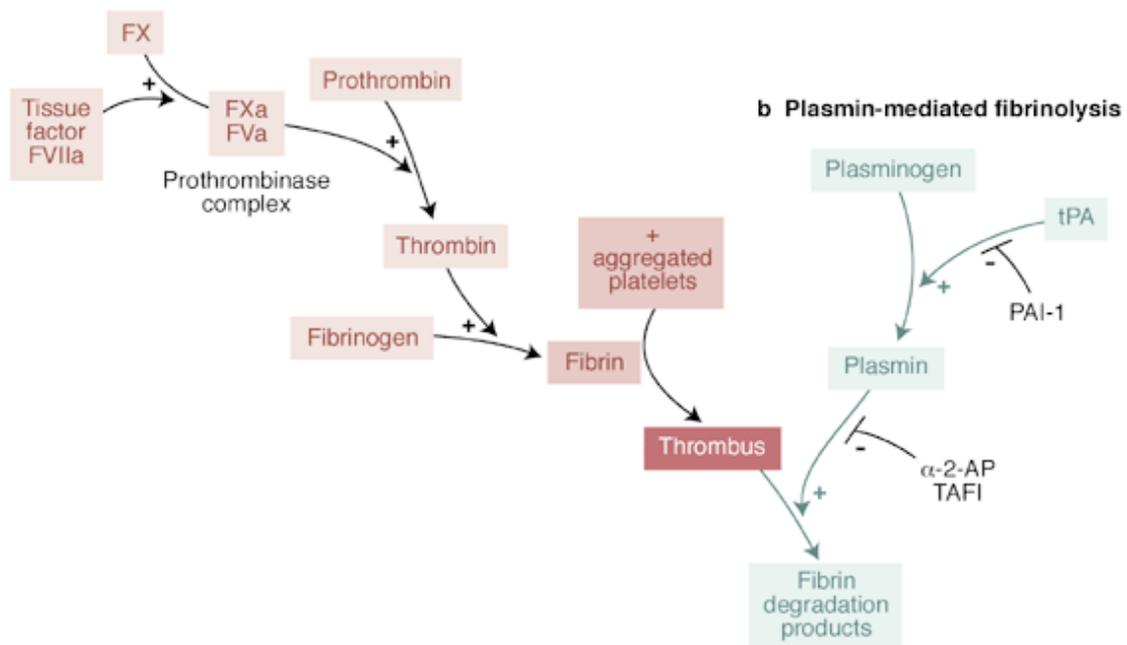


Figura 1: Diagrama resumido dos processos de coagulação e fibrinólise.

tPA= activador tecidual do plasminogénio; PAI-1= inibidor do activador do plasminogénio do tipo 1; α -1-AP= α -2-antiplasmina; TAFI= inibidor da fibrinólise activado pela trombina

Adaptado de Bodary et al 2002.

No paciente diabético, em particular no tipo 2, existe um desequilíbrio do sistema de coagulação documentado por uma maior concentração de fibrinopeptídeo A (quantidade de produto resultante da clivagem enzimática da trombina sobre o quantidade de fibrinogénio, índice da actividade da trombina) e do fragmento 1 e 2 da protrombina (índice de activação da trombina); existe um nível aumentado de

fibrinogénio, dos factores VII, IX, XII, do vWF (que actua como facilitador do factor VIII e como molécula de adesão entre as plaquetas e o colagénio subendotelial através do receptor GPIb) e da caliceína plasmática (Grant 2007).

A caliceína plasmática é uma protease serínica que liberta bradicinina por clivagem proteolítica do seu precursor, o cininogénio, o que leva ao aumento da permeabilidade dos vasos sanguíneo, simulando alguns aspectos da resposta inflamatória. A caliceína pode activar o factor XII e o plasminogénio, e é também importante nos mecanismos da fase de contacto da via intrínseca da cascata da coagulação e na geração de actividade fibrinolítica.

Em pacientes com DMT2 o nível de fibrinogénio (que se transforma em fibrina para formação do coágulo) encontra-se aumentado tanto na presença como ausência da patologia microvascular. Existe uma diferença significativa entre indivíduos com e sem DMT2, em que o nível de fibrinogénio está bastante aumentado em pacientes que realizam terapia insulínica (Missov *et al* 1996). Um facto interessante depreende-se de um estudo que demonstra que, em condições de normoglicemia e normo-aminoacidemia, a produção de fibrinogénio torna-se aumentada se for administrada insulina ao paciente com DMT2, mas não aumenta se essa administração for feita em indivíduos sem a patologia (Barazzoni *et al* 2003).

A glicosilação não enzimática do fibrinogénio que ocorre no paciente diabético leva à formação de filamentos de fibrina mais finos mas mais fortemente entrelaçados, criando uma estrutura mais densa e, portanto, mais resistente à acção de actividade fibrinolítica (Grant 2007). Quanto aos inibidores da coagulação, como a antitrombina III, esta encontra-se geralmente diminuída, apresentando uma menor capacidade inibitória da trombina (cuja função é estimular a fragmentação do fibrinogénio para formar os monómeros da fibrina de modo a formar o coágulo), como também se encontra diminuída a proteína C (anticoagulante fisiológico), provavelmente por efeito da glicosilação.

A actividade fibrinolítica também se encontra reduzida, principalmente devido ao aumento, já referido, da concentração sanguínea do inibidor do activador do plasminogénio, PAI-1, cuja secreção aumenta com a concentração de insulina, de

glicose, de angiotensina II, a obesidade e a hiperlipidemia (Kamgar *et al* 2006). Os efeitos dos níveis aumentados de PAI-1 na DMT2 estão representados na Figura 2.

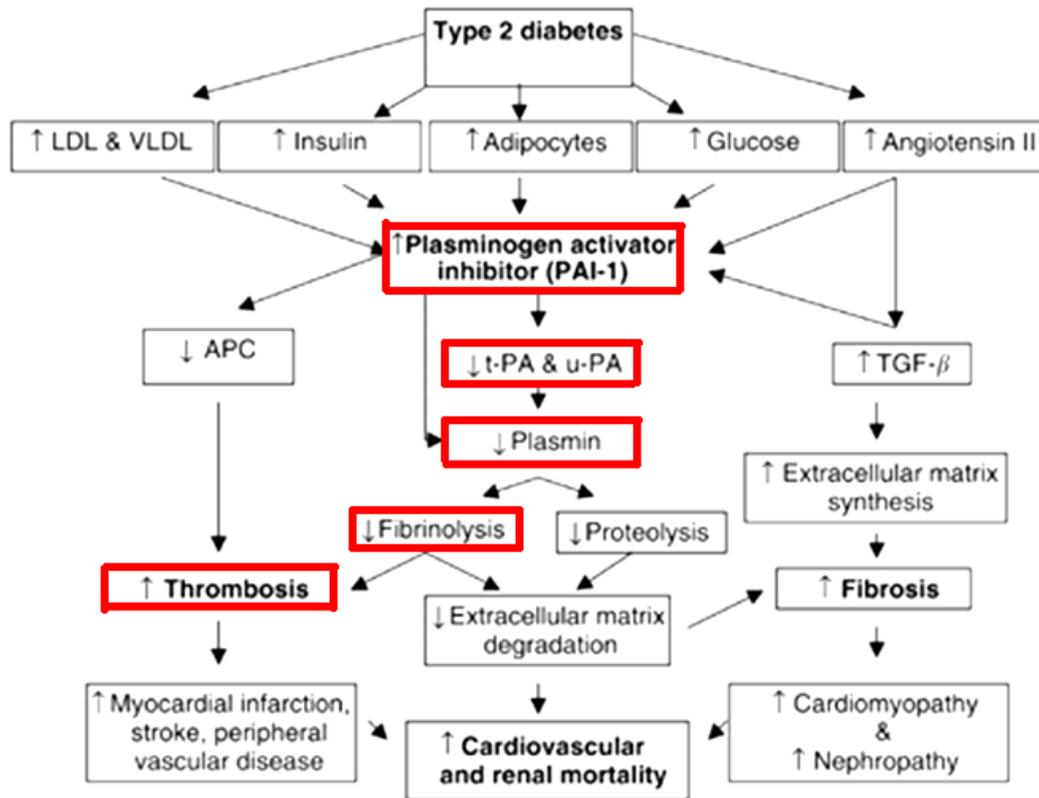


Figura 2: Diagrama representativo dos efeitos dos níveis aumentados de PAI-1 na DMT2. Em destaque, nas caixas a vermelho, verifica-se a ocorrência de uma diminuição dos níveis de plasmina por inibição do t-PA, levando a uma diminuição da fibrinólise que origina um estado pró-trombótico.

APC= proteína C activa, LDL= lipoproteínas de baixa densidade, VLDL= lipoproteínas de muito baixa densidade; PAI-1= inibidor do activador de plasminogénio, t-PA= activador do plasminogénio tipo tecidual, u-PA= activador do plasminogénio tipo urocinase, TGF-β= factor de crescimento transformador β, ECM= matriz extracelular

Adaptado de Kamgar et al 2006.

1.3 Factores de regulação da cascata da coagulação

Ambas as vias da coagulação, intrínseca e extrínseca, são firmemente reguladas por meio de enzimas activas com um tempo médio de vida curto, facto que é superado pela amplificação do produto final, característico das cascatas de proteínases. A via intrínseca ocorre no interior dos vasos sanguíneos, enquanto que na via extrínseca ocorre extravasamento de sangue dos vasos para os tecidos conjuntivos. Quando o sistema de coagulação é activado, pela via intrínseca ou extrínseca, ocorre a formação do complexo protrombinase nas membranas fosfolipídicas. O complexo protrombinase é formado com o factor Va e o factor Xa (o factor Va liga-se à membrana fosfolipídica e a ele associa-se o FXa para clivar a protrombina, na presença de iões de cálcio) e gera trombina activa pela dupla clivagem da protrombina mediada pelo factor Xa. A geração da trombina é considerada a etapa crítica na cascata da coagulação, pois medeia as funções que levam à formação dos coágulos pela clivagem do fibrinogénio e do factor XIII e a activação de plaquetas.

Na cascata da coagulação, a acção de proteases serínicas é essencial para a manutenção do processo normal de formação do coágulo. A calicreína plasmática é uma protease serínica que, como já foi referido, liberta bradicinina a partir do cinogénio, o que leva ao aumento da permeabilidade dos vasos sanguíneos, simula mecanismos da resposta inflamatória, e tem uma participação importante em mecanismos da via intrínseca da coagulação e na fibrinólise: activa, numa reacção recíproca, o factor XII depois de ligar-se a uma superfície com carga negativa (Van Der Graaf *et al* 1983); parece mediar a activação da pró-urocinase e acelerar a formação de plasmina (degrada os coágulos de fibrina) (Tsuda *et al* 2001). As proteases serínicas do sistema de coagulação são reguladas pelos inibidores de proteases serínicas, que exercem uma acção inibitória sobre essas enzimas.

1.3.1 Inibidores de proteases serínicas da cascata da coagulação

Como inibidores de proteases serínicas da coagulação sanguínea são importantes as serpinas e a alfa-2-macroglobulina (A2M) (Krarup *et al* 2007), que serão abordadas

seguidamente. Vários inibidores de proteases serínicas são capazes de inactivar a protease serínica calicreína, entre os quais a A2M e a alfa-1-antitripsina (SERPINA1) (Van Der Graaf *et al* 1983).

1.3.1.1 Serpinas

As serpinas pertencem a uma super-família de proteínas que regulam diversas funções, incluindo a inibição de proteases serínicas que participam na cascata da coagulação. O principal determinante de especificidade da serpina parece ser o resíduo P1 localizado na sequência de reconhecimento de substrato que integra o *loop* do local activo (Stasi *et al* 2009).

Existem diversas serpinas, contudo a antitrombina (SERPINC1) é a principal serpina envolvida na regulação das proteinases da coagulação sanguínea, tendo como alvo a trombina, factores Xa, IXa, XIa e XIIa. Este inibidor exerce também uma função reguladora importante na geração de trombina. A nível estrutural, a SERPINA1 possui uma grande homologia estrutural com a antitrombina, exercendo uma função reguladora igualmente importante no mecanismo de coagulação/fibrinólise: possui uma afinidade moderada para a plasmina e trombina (processo de fibrinólise), e inibe irreversivelmente o activador do plasminogénio (Emmerich 2009, Niemann *et al* 1992). Além disso, como já foi referido, tem a capacidade de inibir a calicreína (Van Der Graaf *et al* 1983).

A SERPINA1 é sintetizada no retículo endoplasmático dos hepatócitos. A sua capacidade inibidora ocorre através de um mecanismo de “ratoeira”, em que o *loop* do local activo (RCL) estende-se para fora da estrutura da proteína e liga-se directamente à protease-alvo. A protease cliva a serpina no local reactivo do RCL, estabelecendo uma ligação covalente entre o grupo carboxílico do local activo da serpina e o grupo hidroxila da protease serínica: o complexo serpina-protease é altamente estável. Um factor crucial para o sucesso da inibição da protease pela SERPINA1 é a ligação entre estas duas moléculas estar assegurada pela conformação nativa da SERPINA1 (Figura 3) (Carrell *et al* 2002, Irving *et al* 2000).

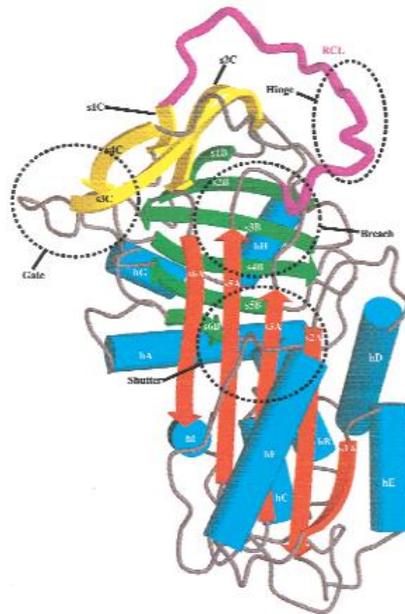


Figura 3: Representação da estrutura molecular nativa da alfa-1-antitripsina (SERPINA1)

Adaptado de Irving et al 2000

1.3.1.2 Alfa-2-macroglobulina

A alfa-2-macroglobulina (A2M) é uma glicoproteína capaz de inibir todas as quatro classes de proteases serínicas através de um único mecanismo de armadilha. A forma nativa da A2M não se liga a nenhum receptor, no entanto, através de uma reacção com pequenas aminas primárias como a metilamina, ou com ligandos de proteínas, sofre uma mudança conformacional originando a forma activada da A2M: a protease serínica cliva a A2M no domínio *bait* (de ligação), que contém ligações peptídicas que são facilmente hidrolisadas por várias proteinases e sofre a referida alteração de conformação (Boer *et al* 1993).

A A2M é sintetizada por vários tipos de células, incluindo fibroblastos do pulmão, monócitos-macrófagos, hepatócitos, astrócitos e alguns tipos de células tumorais (Borth 1992). Constitui um inibidor natural de várias proteases serínicas como a catepsina, colagenase, elastase, tripsina e proteínas que participam na cascata da coagulação como a calicreína, plasmina, factor Xa, activador de plasminogénio e trombina. As proteinases referidas são inibidas pela formação de um complexo irreversível. Deste modo, funciona como inibidor da fibrinólise através da inibição da plasmina e calicreína, e como inibidor da coagulação pela inibição da trombina (Boer *et al* 1993).

1.4 Processo de cicatrização no paciente com DMT2

Quando ocorre dano endotelial e é desencadeada a cascata de coagulação/fibrinólise, o objectivo deste processo de formação do coágulo de fibrina prende-se com a cicatrização do tecido que foi lesado. Visto que a bibliografia existente sobre a DMT2 refere um estado de hipercoagulação e hipofibrinólise característico desta condição, o processo de cicatrização que está directamente relacionado com a coagulação/fibrinólise sanguínea também estará comprometido. Deste modo, faz todo o sentido encontrar as alterações na coagulação/fibrinólise que têm implicação no processo de cicatrização.

Pode afirmar-se que a cicatrização constitui uma resposta proliferativa que visa a reparação do tecido injuriado ou perdido. É um fenómeno complexo, envolvendo o recrutamento de células inflamatórias, proliferação e migração de células do parênquima e do tecido conjuntivo, precedido de angiogénese e formação de tecido conjuntivo (Thomson *et al* 2010).

Para que o processo de cicatrização ocorra normalmente, é importante existir um equilíbrio entre a síntese de matriz extracelular (ECM) e a sua degradação, tal como a indução da formação de novos vasos sanguíneos (Falanga 2005). Estes processos são fortemente regulados por factores de crescimento, como o factor de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), o factor de crescimento endotelial vascular (VEGF) e o factor de crescimento de tecido conjuntivo (CTGF), e por enzimas de degradação da matriz extracelular, as metaloproteinases da matriz (MMPs). Estudos sobre o processo de cicatrização em pacientes diabéticos demonstram que existem concentrações diminuídas das proteínas PDGF e VEGF no tecido da ferida (Keswani *et al* 2004).

O microambiente da ferida na DMT2 é alterado por vários processos, incluindo infiltração celular anormal e formação vascular comprometida. Existe uma inflamação prolongada, com angiogénese comprometida, bem como defeitos na função dos macrófagos e síntese de colagénio diminuída. Os macrófagos são importantes para o processo de cicatrização pois produzem factores de crescimento e citocinas que atraem fibroblastos e células endoteliais, e participam na regulação da síntese de MMPs, enzimas importantes para a remodelação do tecido de granulação (Thomson *et al* 2010).

Durante a cicatrização, ocorre um largo espectro de eventos, incluindo agregação plaquetar, activação da cascata de coagulação, infiltração inflamatória, diferenciação celular e remodelação tecidual, que decorrem em três fases distintas (inflamação, proliferação e contracção e, por fim, remodelação da ferida). O dano tecidual continuado ou renovado pode reiniciar a sequência de eventos nos locais afectados de uma ferida existente (Peppia *et al* 2009).

Fase inflamatória

O dano tecidual e ruptura de vasos sanguíneos são precedidos da formação do coágulo de fibrina que fornece o substrato para a migração celular na ferida. Os neutrófilos, atraídos por várias moléculas, fagocitam bactérias e corpos estranhos, sendo gradualmente substituídos por macrófagos. Estes fagocitam microorganismos, fragmentos da matriz extracelular, fibrina, neutrófilos, eritrócitos, e produzem factores de crescimento e citocinas que atraem fibroblastos e células endoteliais, responsáveis pela produção de MMPs, para remodelação do tecido de granulação (Peter *et al* 1999).

Na DMT2, todos os componentes desta fase parecem estar desregulados, levando a um atraso na cicatrização. O factor de expressão tecidual dos queratinócitos, fibroblastos e células do músculo liso encontra-se diminuído (Chen *et al* 2005). Além disso, foi observado um comprometimento na produção de citocinas, na quimiotaxia e na actividade fagocitária, e um *stress* oxidativo aumentado que parece inibir a activação e migração celular (Wetzler *et al* 2000, Musalmah *et al* 2002). O resultado final constitui uma resposta inflamatória prolongada que suprime, em vez de prosseguir, as fases seguintes do processo de cicatrização.

Fase de proliferação

Esta fase inclui duas etapas, a reepitelização e a formação de tecido de granulação. A reepitelização é mediada pela hipoxia tecidual e vários factores de crescimento que promovem a diferenciação e proliferação das células da camada basal em queratinócitos e a migração destes ao longo do bordo livre da ferida. A formação de tecido de granulação exige a formação de novos vasos sanguíneos e a invasão da matriz extra-celular provisória rica em fibrina/fibronectina pelos fibroblastos, que emergem da matriz de colagénio que rodeia a ferida. A hipoxia tecidual e vários factores

angiogénicos parecem ter um papel importante neste processo, bem como os macrófagos na expressão de vários factores de crescimento e metaloproteínases, regendo a degradação de tecido conjuntivo, locomoção das células endoteliais e neovascularização. A invasão dos fibroblastos promove a expressão e deposição de fibronectina, ácido hialurónico e colagénio I e III que são incorporados na nova matriz extracelular, sendo diferenciados em miofibroblastos os quais sintetizam uma matriz mais colagenosa o que facilita a contracção e remodelação da ferida (Thomson *et al* 2010).

Tem sido observado que as feridas nos diabéticos contêm concentrações significativamente menores de factores de crescimento, o que está em parte associado aos efeitos adversos dos produtos gerados pela peroxidação dos lípidos (Loot *et al* 2002). Além disso, tem sido observada uma expressão desregulada das MMPs, levando a uma actividade proteolítica anormal e degradação descontrolada de várias macromoléculas (Tregrove 1999), paralelamente os fibroblastos possuem uma capacidade migratória diminuída e uma função secretora anormal. Também os queratinócitos têm uma proliferação atenuada e alterações na morfologia e diferenciação (Lobmann *et al* 2006).

Tem sido demonstrado que a DMT2 exerce um efeito pró-apoptótico nos fibroblastos alterando a expressão genética e induzindo a actividade de caspases (enzimas envolvidas no processo de apoptose). Esta actividade aumentada de caspases também pode ser amplificada pela contínua resposta inflamatória e expressão desregulada das citocinas (Al-Mashat *et al* 2006). Cortes histológicos revelaram, também, uma reepitelização diminuída e menor proliferação e migração de células mesenquimatosas no coágulo de fibrina, formação de novos vasos sanguíneos diminuída e baixa densidade de matriz extracelular (Singer *et al* 1999).

Contracção e remodelação da ferida

Durante esta fase, ocorre um processo complexo levando à diferenciação de fibroblastos que invadem o coágulo e se diferenciam em miofibroblastos contrácteis (Singer *et al*, 1999). Vários factores de crescimento, proteínas da matriz extracelular e receptores de integrinas parecem exercer um papel sinérgico importante. O vasto tecido de granulação celular e vascular origina, posteriormente, um tecido cicatricial menos celular e menos vascular através de um processo assinalado pela supressão da

secreção de proteases e pela síntese e deposição aumentada de colagénio. Este processo, juntamente com o efeito pró-fibrótico do factor transformador de crescimento (TGF- β) e a consequente apoptose das células invasoras, resulta na substituição gradual do tecido de granulação por um tecido de cicatrização acelular composto por pequenas fibras de colagénio (Al-Mashat *et al* 2006).

Na DMT2, a diferenciação tardia de fibroblastos em miofibroblastos, em conjunto com a fadiga celular, podem contribuir para a dificuldade na fase de contracção e remodelação da ferida. Em geral, a fase inflamatória aumentada e continuada, a sobrevivência celular diminuída, a fadiga celular e o distúrbio na produção de factores de crescimento podem resultar em insucesso na contracção do tecido da ferida e na remodelação em tecido cicatricial menos celular e quase avascular (Peppas *et al* 2009).

Para além dos factores descritos, outros têm sido relacionados com a hiperglicemia como estando associados à dificuldade de cicatrização na DM, incluindo os produtos finais de glicolisação avançada (AGE). Existe uma larga evidência de estudos realizados *in vivo* e *in vitro* que indicam que os AGE podem desempenhar um papel importante na patogénese da cicatrização comprometida na DMT2, afectando negativamente vários componentes do processo de cicatrização. A acumulação de AGE nos tecidos do diabético (incluindo o tecido da ferida) e a sua interacção com receptores celulares específicos como os receptores de produtos finais de glicosilação avançada (RAGE) tem sido associada à diminuição da migração transendotelial de neutrófilos, levando a hipocelularidade e uma resposta inflamatória anormal (Toth *et al* 2008).

Estudos em ratos diabéticos, mostraram que a expressão de RAGE está aumentada nos tecidos da ferida, paralelamente a um aumento da acumulação de AGE e resposta inflamatória também aumentada (Goova *et al* 2001). Podem ser sugeridas estratégias anti-AGE incluindo agentes anti-AGE ou modificação de AGE na dieta, de modo a prevenir ou tratar o atraso no processo de cicatrização no diabético (Peppas *et al* 2009).

Como já foi referido, os efeitos do TGF- β 1 na síntese de matriz extracelular e no fenótipo celular são cruciais na fase final da cicatrização, tal como a deposição de colagénio, supressão da secreção de MMPs ou sua diminuição e diferenciação de

fibroblastos em miofibroblastos contrácteis. A glicosilação não enzimática nos tecidos da ferida tem sido associada a uma apoptose prematura dos fibroblastos e, como resultado, uma síntese diminuída de colagénio, enquanto que uma concentração inadequada de miofibroblastos perturba a contracção da ferida.

Um estudo de Tomasek e colaboradores (2002) evidenciou que a matriz de colagénio possui fibras estáveis, menos plásticas e deformáveis que exercem tensões nos fibroblastos o que pode levar à sua diferenciação em miofibroblastos contrácteis, os quais geram forças que levam a uma resistência à contracção.

Todos estes mecanismos alterados que foram abordados, levam a uma dificuldade de cicatrização das feridas de pacientes diabéticos. Esta complicação tem particular relevância em Medicina Dentária, pois a cicatrização após tratamentos dentários invasivos não ocorre normalmente, o que pode também originar infecções com facilidade acrescida. Seguidamente serão abordadas as complicações a nível oral mais relevantes da DMT2, para além da dificuldade de cicatrização.

1.5 Complicações orais da DMT2

A hiperglicemia crônica que ocorre na Diabetes, além de prejudicar vários órgãos como rins, olhos, nervos, vasos sanguíneos e coração, pode também estar associada a alterações orais como doença periodontal, e outras alterações que muitas vezes podem aparecer antes e predispor à doença periodontal, como o comprometimento da função das glândulas salivares que levam a uma redução do fluxo salivar (xerostomia) e alteração na composição da saliva, alteração do paladar, síndrome da boca ardente, maior tendência para desenvolver infecções orais, atraso no processo de cicatrização, halitose, lesões de cárie e líquen plano (Negrato *et al* 2010).

1.5.1 Dificuldades no processo de cicatrização

Como já foi descrito, o processo de cicatrização encontra-se limitado na DMT2 e, por consequência, também a cicatrização na cavidade oral se encontra comprometida, o que constitui um factor de risco na maioria dos tratamentos dentários, sendo necessário mais tempo para que ocorra cicatrização após tratamentos dentários invasivos, como exodontias e cirurgia periodontal.

1.5.2 Alterações das glândulas salivares e da saliva

No paciente diabético pode ocorrer um aumento do volume das parótidas, geralmente assintomático. A sialodenoze é uma doença multifactorial das glândulas salivares, geralmente assintomática, caracterizada por um crescimento bilateral doloroso, das glândulas salivares, normalmente as parótidas. Este crescimento é geralmente precedido por uma diminuição na produção de saliva, levando à ocorrência de xerostomia. Esta patologia não é inflamatória nem tumoral, mas sim degenerativa, estando relacionada com alterações na regulação neuro-autonómica da glândula, causada por uma desmielinização e consequente atrofia das células mioepiteliais. Isto

leva a um comprometimento do mecanismo de secreção, resultante da estimulação dos receptores alfa e beta adrenérgicos das células acinares que, fisiologicamente, induzem exocitose. Na sialodense diabética, o aumento de volume da glândula é devido à infiltração adiposa no parênquima, alterações observadas tanto nas células acinares como ductais (Carda *et al* 2005).

Quando existe diminuição do fluxo salivar, podem ocorrer várias alterações a nível oral, tais como: maior concentração de mucina e glicose; comprometimento da produção e/ou acção de vários factores antimicrobianos; ausência de uma metaloproteína denominada gustina, responsável pela constante maturação das papilas gustativas; alteração do paladar; candidíase oral; maior exfoliação celular após contacto devido à fraca lubrificação; maior proliferação de microrganismos patogénicos; língua saburrosa; halitose (Vernillo 2003).

Muitas vezes, a hipossalivação é tão intensa que o paciente diabético refere sentir a boca seca. A xerostomia (sensação subjectiva de boca seca) está geralmente associada com uma diminuição da produção de saliva, e é referida por 10 a 30% dos pacientes diabéticos (Neville *et al* 2004, Tófoli *et al* 2005). A hipossalivação pode causar glossodínia, ulcerações, queilite, língua fissurada, cáries e dificuldade em manter a aderência/retenção da prótese o que pode levar a trauma dos tecidos, o que por sua vez, pode predispor a infecções (Vasquez *et al* 2005). Dada a importância da saliva na manutenção e preservação da saúde oral, seria importante incluir a avaliação da função salivar no paciente diabético. Esta avaliação pode ser realizada através da sialometria, procedimento que permite medir o fluxo salivar (quantidade de saliva por minuto), constituindo uma técnica não-invasiva, rápida, com baixo custo e que fornece informação acerca das alterações das glândulas salivares e/ou destruição.

Vários estudos têm sido realizados no sentido de caracterizar as alterações bioquímicas da saliva encontradas em pacientes diabéticos. Estas alterações estão relacionadas com a concentração de glicose, níveis totais de proteínas, albumina, lisozimas, peroxidase, electrólitos (sódio, potássio, cloro, fósforo, magnésio e cálcio), amilase, IgA e capacidade tampão. No estudo de Carda *et al* 2006, foram encontrados níveis aumentados de ureia e do total de proteínas, e níveis reduzidos de microalbumina na saliva de pacientes diabéticos. Foram identificadas elevadas concentrações de glicose

na saliva apenas em pacientes diabéticos com HbA1c \geq 8.0% (quantidade de hemoglobina glicosilada). Estas alterações bioquímicas podem estar relacionadas com as mudanças estruturais previamente descritas que são observadas nas glândulas parótidas. No estudo de Pacheco *et al* 2005, verificou-se a existência de alterações no fluxo salivar e na concentração de cálcio, na saliva de pacientes com DMT2, tendo implicação no desenvolvimento de cáries. A conclusão final é que apesar de um bom controlo metabólico, o paciente com DMT2 apresenta alterações na composição e/ou produção de saliva.

1.5.3 Maior tendência para infecções orais

O paciente diabético é mais susceptível ao desenvolvimento de infecções e abscessos na cavidade oral o que, por sua vez, pode prejudicar o controlo glicémico. Essa susceptibilidade a infecções, nomeadamente por fungos como a candidíase, é potenciada pela presença de níveis aumentados de glicose na saliva, baixa produção de saliva e alterações na composição da saliva, através de modificações no seu conteúdo de proteínas anti-microbianas como lactoferrina, lisozima e lactoperoxidase (Tekeli *et al* 2004).

Existe também maior tendência do diabético para outros tipos de infecções, dado que a função do sistema imunitário se encontra comprometida, uma vez que as células polimofonucleares apresentam uma quimiotaxia menor bem como a fagocitose, e ambas as situações levam a uma diminuição na acção anti-bacteriana desempenhada por estas células. Para além deste facto, a microcirculação pode ser afectada, levando a uma diminuição no fornecimento de oxigénio, o que pode contribuir para uma susceptibilidade aumentada do diabético a infecções, não só na cavidade oral como em todo o corpo (Beikler *et al* 2003).

1.5.4 Maior predisposição à Doença Periodontal

Reconhece-se que a Doença Periodontal é mais prevalente e mais grave em indivíduos diabéticos. Em pacientes com DMT2, o risco de desenvolver Doença Periodontal é três vezes maior do que na população em geral (Vernillo 2003). Um estudo realizado com pacientes diabéticos *versus* grupo de controlo mostrou que 100% dos pacientes diabéticos apresentava Doença Periodontal, enquanto que no grupo de controlo apenas 50% apresentavam a doença (Carda *et al* 2006).

Para compreender a associação entre estas duas patologias, têm sido realizadas investigações no sentido de encontrar mecanismos biológicos específicos. Estima-se que a Diabetes promove a Periodontite através de uma resposta inflamatória exagerada ao microbiota do periodonto, no entanto a microflora subgingival em pacientes com Periodontite que têm Diabetes é geralmente equivalente à observada em pacientes com Periodontite que não têm um diagnóstico de Diabetes (Lamster *et al* 2008).

Mais recentemente tem sido demonstrado que os pacientes diabéticos são mais susceptíveis ao desenvolvimento de Doença Periodontal devido ao facto de apresentarem um comprometimento na função dos leucócitos polimorfonucleares, anomalias no metabolismo do colagénio e na formação de produtos finais de glicosilação, AGE, que afectam negativamente a estabilidade do colagénio e a integridade vascular. Estes AGE ao ligarem-se aos receptores de macrófagos e monócitos podem aumentar a interleucina-1 (IL-1) e o factor de necrose tumoral alfa (TNF- α) (Negrato *et al* 2010), o que provoca uma aumento da resposta inflamatória e consequente aumento da susceptibilidade para destruição tecidular.

Foi sugerido que o aumento de AGE e a sua interacção com receptores de produtos finais de glicosilação avançada (RAGE) na gengiva de doentes diabéticos, leva a um aumento da permeabilidade vascular, e diminuição da integridade tecidular e função de barreira. O aumento de AGE no tecido atrai e imobiliza monócitos com a libertação de citocinas pró-inflamatórias e metaloproteinases da matriz (MMPs). Outras células, como fibroblastos, são afectadas pelos AGE e podem conduzir a um aumento de MMPs e uma diminuição da produção de colagénio. Foi igualmente sugerido que a interacção entre AGE, monócitos e RAGE resulta na produção crónica de mediadores pró-inflamatórios como IL-1 β , TNF- α e IL-6, cujos efeitos incluem a activação de osteoclastos e MMPs. Esta cascata de eventos parece estar implicada na resposta

exagerada aos agentes patogénicos, resultando na destruição acelerada de tecido conjuntivo e ósseo (Pucher *et al* 2004, Nassar *et al* 2007).

Como a circulação na área periodontal se torna mais lenta, faz com que a gengiva e tecido ósseo fiquem mais vulneráveis a infecções. A redução na produção de colagénio também tem implicações na patologia periodontal, pois constitui um importante componente do tecido que suporta o dente, bem como a redução do fluxo salivar, dado que a saliva ajuda a controlar o crescimento de bactérias e a evitar a formação de placa (Taylor *et al* 2008).

Existe uma evidência extensa que indica uma relação entre um mau controlo glicémico e a Doença Periodontal, no entanto, não existe informação conclusiva que sugira que o controlo metabólico rígido melhore o estado periodontal sem tratamento periodontal. Está, no entanto, bem documentado o facto de que pacientes com controlo glicémico respondem tão bem ao tratamento periodontal como os pacientes não-diabéticos (Pucher *et al* 2004, Nishimura *et al* 2007).

Os tecidos periodontais são estruturas orais muito afectadas na DMT2, existindo uma relação bidireccional entre a Doença Periodontal e a Diabetes: a DM predispõe ao desenvolvimento da Doença Periodontal a qual, por sua vez, contribui para o descontrolo glicémico. Vários mecanismos envolvidos na fisiopatologia da Doença Periodontal estão associados à dificuldade de cicatrização na cavidade oral, característica da DMT2, nomeadamente a produção de produtos de glicosilação avançada (AGE) que afectam os fibroblastos e levam a uma menor produção de colagénio. Além disso, na Doença Periodontal são activadas substâncias pró-inflamatórias que levam uma resposta inflamatória prolongada que suprime as fases seguintes do processo de cicatrização. Deste modo, os efeitos no processo de cicatrização a nível da cavidade oral provocados pela DMT2 são ampliados na presença de Doença Periodontal.

O conhecimento dos mecanismos envolvidos na fisiopatologia da Doença Periodontal associada à DMT2 tem bastante relevância na Medicina Dentária, permitindo ao profissional orientar os pacientes com DMT2 sobre a necessidade de bom controle glicémico e higiene oral adequada para minimizar os riscos de Doença Periodontal.

1.6 Diagnóstico da DMT2

A Diabetes constitui-se como uma doença complexa, ainda que o seu diagnóstico seja determinado, muitas vezes, por avaliação de um único biomarcador: a concentração de glicose. O nível de hiperglicemia altera-se ao longo do tempo e reflecte tanto a severidade do processo metabólico subjacente como o sucesso do tratamento (ADA 2011).

As *guidelines* de tratamento da ADA (*The American Diabetes Association*) sugerem que a concentração de glicose no plasma deverá encontrar-se entre os níveis de 90-130 mg/dl (5.0-7.2 mmol/l).

Durante décadas, o diagnóstico da DM baseava-se apenas na determinação da glicose no plasma, quer a glicose plasmática de jejum ou o valor de glicose após 2 horas da ingestão de 75g de glicose (teste oral de tolerância à glicose). Em 2009, o *International Expert Committee*, que inclui representantes da ADA, da *International Diabetes Federation* (IDF) e da *European Association for the Study of Diabetes* (EASD), recomendou a utilização do teste A1C/HbA1c (medição da hemoglobina glicosilada) para diagnóstico da Diabetes, com um limiar de 6,5% (*International Expert Committee*, 2009), e a ADA adoptou este critério em 2010. O teste A1C representa a quantidade de hemoglobina que está glicosilada, estimando a glicemia média dos últimos 3 meses (representa o tempo médio de vida de um eritrócito). Deste modo, este teste constitui também um meio cómodo e preciso de seguir o controlo glicémico de um paciente já diagnosticado com DM (Skamagas *et al* 2008).

Os critérios da glicose estabelecidos para o diagnóstico da DM (glicose de jejum e teste de tolerância à glicose) permanecem também válidos. Resumidamente, os critérios para o diagnóstico da Diabetes são (ADA 2011):

- HbA1c \geq 6,5%: o teste deve ser realizado em laboratório utilizando um método certificado pela NGSP (*National Glycohemoglobin Standardization Program*) e estandardizado pelo ensaio DCCT (*Diabetes Control and Complications Trial*);

ou

- Glicose plasmática de jejum ≥ 126 mg/dl (7.0 mmol/l). O jejum é definido como a ausência de ingestão calórica durante pelo menos 8 horas.

ou

- Glicose plasmática de 2 horas ≥ 200 mg/dl (11.1 mmol/l) durante o teste de tolerância à glicose: deve ser realizado de acordo com a descrição feita pela Organização Mundial de Saúde, utilizando uma carga de glicose contendo o equivalente a 75 g de glicose anidra dissolvida em água.

ou

- Em um paciente com sintomas clássicos de hiperglicemia ou crise hiperglicêmica, glicose plasmática ≥ 200 mg/dl (11.1 mmol/l).

Com o desenvolvimento de metodologias na área da Proteômica, visando o esclarecimento de mecanismos moleculares envolvidos em condições patológicas, o estudo de proteomas de tecidos e fluidos do organismo, nomeadamente a saliva, poderá permitir, futuramente, auxiliar no desenvolvimento de novas técnicas de diagnóstico da DMT2, principalmente através da identificação de biomarcadores salivares da patologia.

1.7 A Proteómica e a Bioinformática no estudo da DMT2

A Proteómica tem como objectivo principal a avaliação da presença/ausência, quantidades e modificações pós-tradução de todas as proteínas presentes numa determinada amostra biológica (o proteoma). A comparação de proteomas permite clarificar mecanismos moleculares implicados em doenças, por comparação com fenótipos padrão.

A DMT2 constitui-se como uma doença muito complexa e com expressão alterada de muitas proteínas e seus produtos como pudemos evidenciar ao longo da nossa introdução.

No entanto, todos os estudos apresentados estão centrados na avaliação da presença e quantidade de apenas algumas proteínas em tecidos, ou então resultado de estudos em culturas de células ou em modelos animais. Os estudos de proteómica da DMT2 permitem caracterizar as alterações de expressão de todas as proteínas presentes em múltiplos tecidos e fluidos biológicos.

A avaliação integral de todas as proteínas permite compreender as implicações das alterações ao nível dos mecanismos moleculares de sinalização em que as proteínas alteradas participam. Existem, actualmente, alguns estudos de proteómica realizados em pacientes com DMT2, com identificação de proteínas alteradas (Sundsten *et al* 2009).

Os estudos de ciências Ómicas geram uma vasta informação. Nesse sentido, o recurso a ferramentas bioinformáticas é crucial para analisar o elevado número de informação, nomeadamente a quantidade de proteínas identificadas, suas estruturas e funções, de modo a integrar os resultados obtidos e comparar com a informação disponível em bases de dados.

Considerando a existência de uma vasta informação experimental e bibliográfica sobre mecanismos moleculares envolvidos em patologias, como é o caso da DMT2, seria quase impossível e extremamente moroso analisar e estudar toda a informação que existe de modo a estabelecer relações entre proteínas envolvidas e a patologia. As ferramentas informáticas permitem relacionar e analisar os dados existentes, como: identificar genes e respectiva proteína, prever e comparar a estrutura de proteínas, identificar inibidores de enzimas, organizar e relacionar informação a biológica, agrupar proteínas homólogas, entre outros inúmeros resultados. As ferramentas informáticas de

pesquisa e análise avançada de dados actualmente disponíveis, permitem identificar mecanismos moleculares facilitando o esclarecimento de patologias, bem como a identificação de terapêuticas específicas e de critérios de diagnóstico.

Conclui-se que a Bioinformática conjuntamente com a evolução do instrumental para estudos de proteómica tornaram-se em ferramentas extremamente abrangentes e que permitem adquirir e relacionar informação.

Sendo a saliva um fluido biológico complexo e que pode constituir um meio adequado para o diagnóstico, o conhecimento do proteoma salivar da DMT2 permitirá elucidar a biologia da cavidade oral e esclarecer os mecanismos moleculares e fisiopatológicos desta condição.

2. Objectivos

Sendo a DMT2 uma patologia de etiologia multifactorial prevalente e com claras implicações na Saúde Oral, principalmente pela dificuldade acrescida de cicatrização, torna-se relevante a análise dos resultados do proteoma salivar sobre no sentido de identificar as proteínas alteradas na saliva do paciente diabético que tenham participação importante na coagulação sanguínea e fibrinólise, dois mecanismos fundamentais para o processo de cicatrização o qual, como a vasta informação bibliográfica documenta, se encontra comprometido no paciente diabético.

A análise do proteoma salivar na DMT2 tem particular importância pois, actualmente, não existem estudos publicados que esclareçam que as proteínas responsáveis pela hipercoagulação e hipofibrinólise características da DMT2, com implicação evidente na cicatrização, se encontram presentes na saliva. Deste modo, propomo-nos:

- Catalogar todas as proteínas identificadas como alteradas em estudos de proteómica na DMT2 e depositá-las na base de dados do OralCard;
- Avaliar as implicações funcionais das proteínas salivares identificadas como alteradas, presentes no proteoma salivar da DMT2;
- Determinar interacções das proteínas alteradas presentes na saliva na DMT2 e que estejam implicadas na coagulação/fibrinólise e, consequentemente, na cicatrização na saliva do paciente com DMT2;
- Sugerir causas moleculares responsáveis por alterações das vias de sinalização identificadas como comprometidas na DMT2, como contributo para o esclarecimento da desregulação dos processos de coagulação sanguínea e de fibrinólise conducentes à cicatrização comprometida característica da patologia.

3. Material e Métodos

A pesquisa bibliográfica foi realizada com recurso à ferramenta PubMed (PubMed 2009) e Novoseek (Novoseek 2008) e incidiu na recolha de informação sobre o proteoma salivar da DMT2 e revisão bibliográfica sobre os mecanismos moleculares implicados na patologia, com especial incidência no processo de coagulação, fibrinólise e cicatrização.

A lista de proteínas salivares alteradas na DMT2 foi retirada do artigo de Rao *et al* 2009, e avaliou-se se as proteínas alteradas já faziam parte da base de dados do OralCard (OralCard 2011). Foram adicionadas as proteínas que ainda não estavam incluídas na base de dados do proteoma salivar, indicando-se a patologia e a sua alteração (diminuída ou aumentada).

O OralCard constitui uma ferramenta bioinformática que reúne as proteínas da saliva identificadas em várias bases de dados biomédicas, permitindo a caracterização do proteoma salivar quanto ao local de produção da proteína, função, mecanismos moleculares e a sua associação a doenças. Esta ferramenta, disponível *online* (<http://bioinformatics.ua.pt/OralCard/>), tem importância a nível da Medicina Dentária, pois contém a informação sobre todas as proteínas presentes na cavidade oral identificadas até ao momento e em permanente actualização, constituindo-se como ferramenta útil em estudos de biologia da cavidade oral, nomeadamente em estudos de identificação de marcadores moleculares de doenças, possibilitando o desenvolvimento de testes de diagnóstico que visam uma melhoria no prognóstico, ou mesmo para a descoberta de novos agentes terapêuticos.

A análise bioinformática das interacções entre proteínas salivares alteradas na DMT2 foi realizada com recurso às ferramentas bioinformáticas de acesso universal STRING (Szklarczyk *et al* 2011), PANTHER (Mi *et al* 2010, Thomas *et al* 2003), UniProtKB (The UniProt Consortium 2011) e PyMOL (PyMOL, 2008):

- STRING (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes): constitui uma base de dados que contém interacções proteína-proteína. As interacções incluem associações directas (físicas) e indirectas (funcionais), determinadas experimentalmente ou sugeridas na bibliografia, e

interacções previstas de acordo com o conhecimento estrutural das proteínas. Quantitativamente, o STRING integra interacções de dados das fontes referidas para um largo número de organismos. A base de dados, actualmente, contém 5 214 234 proteínas de 1133 organismos.

- Sistema de Classificação PANTHER (Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships): constitui um recurso único que classifica os genes pelas suas funções, utilizando a evidência experimental científica publicada e relações evolutivas para predizer funções apesar da ausência de evidência experimental directa. As proteínas são classificadas em: famílias e sub-famílias de genes (incluindo árvores filogenéticas); classes ontológicas de genes (função molecular, processo biológico, componente celular); classes proteicas e vias de sinalização incluindo diagramas. Para esta última ontologia, permite acesso a representações gráficas de mecanismos de interacção funcionais já determinados. O PANTHER aplica ferramentas de software e tratamento manual de informação para relações com a maior precisão possível, e para mantê-las actualizadas como novos resultados experimentais acumulados. A Batch ID Search constitui a ferramenta de classificação do PANTHER para cada grupo de proteínas, usando os identificadores AC do UniProtKB (sem isoformas de proteínas). É também utilizada a ferramenta de análise de dados de expressão genética do PANTHER para comparar as classificações de vários clusters para uma lista de referência (número total de proteínas humanas em banco de dados do PANTHER) para determinar estatisticamente sobre ou sob-representação das categorias de classificação PANTHER. Cada lista é comparada com a lista de referência usando o teste binomial para cada termo GO do componente celular celular, função molecular ou processo biológico no PANTHER.
- O UniProtKB (UniProt Knowledgebase): é o cubo central para a colecção de informação funcional de proteínas, com anotação precisa, consistente e rica. Além de capturar a informação central obrigatória para cada entrada do UniProtKB (principalmente, a sequência de aminoácidos, nome da proteína ou descrição, dados taxonómicos e informações de citação), anota

todas as informações complementares já disponíveis para essa proteína. Isto inclui ontologias biológicas largamente aceites, classificações e referências cruzadas, e indicações claras da qualidade de anotação na forma de atribuição de evidência de dados experimentais e computacionais. O UniProtKB consiste em duas secções: uma que contém os registos anotados manualmente com informação extraída da literatura e tratada por análise computacional, e uma secção com os registos analisados computacionalmente que aguardam uma anotação manual completa. Estas secções são referidas, respectivamente, como "UniProtKB / Swiss-Prot" (revisto, anotado manualmente) e "UniProtKB / TrEMBL" (sem estar revista, anotada automaticamente).

- PyMOL: constitui um ferramenta de visualização molecular capaz de produzir imagens de alta qualidade da estrutura de moléculas pequenas e macromoléculas biológicas, tais como proteínas.

A metodologia de tratamento da informação que foi seguida encontra-se descrita no fluxograma da Figura 4.

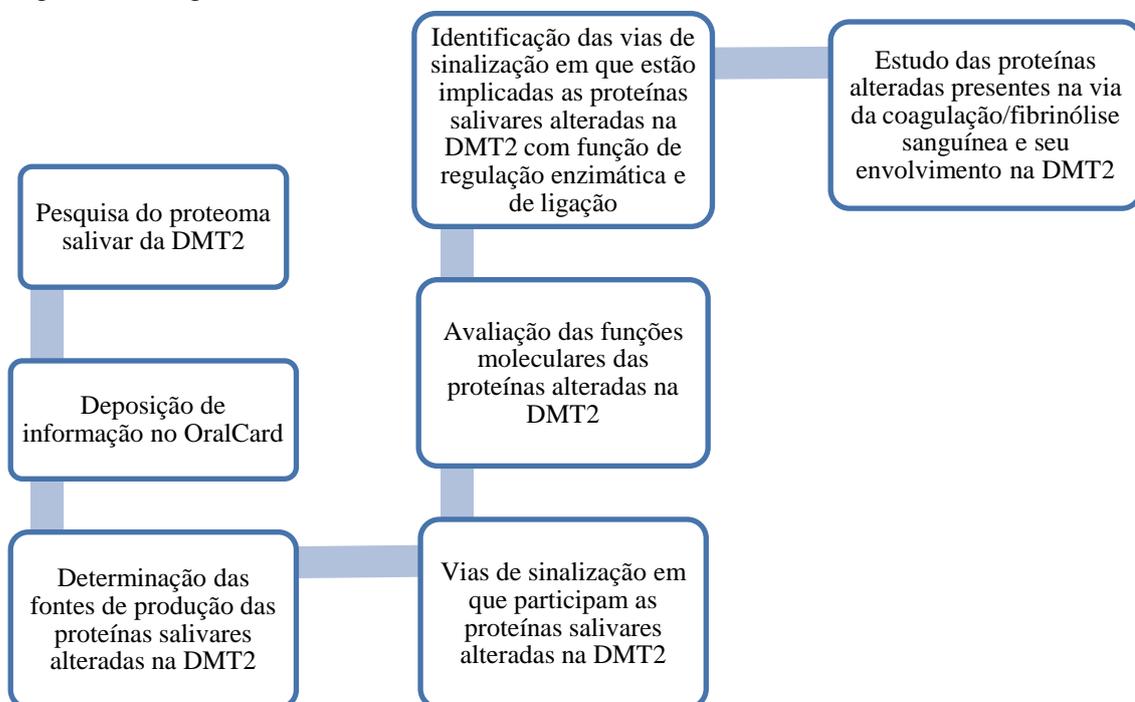


Figura 4: Fluxograma com a metodologia seguida para o tratamento da informação

4. Resultados e Discussão

4.1 Pesquisa do proteoma salivar da DMT2

De modo a compreender quais são as proteínas que se encontram modificadas na saliva do paciente diabético, foi efectuada pesquisa de informação acerca do proteoma salivar da DMT2. Nesse sentido, foi analisado o único estudo de proteómica da saliva conhecido desenvolvido por Rao *et al* 2009, que teve como objectivo a identificação de possíveis biomarcadores salivares da DMT2. A lista de proteínas salivares identificadas como alteradas na DMT2 por Rao *et al* 2009 encontra-se representada na tabela 1.

Através da análise desta lista de proteínas alteradas na DMT2, foi possível verificar que a maior parte das proteínas já se encontrava depositada no OralCard, uma ferramenta bioinformática que reúne todas as proteínas identificadas como estando presentes na saliva.

4.2 Determinação das fontes de produção das proteínas salivares alteradas na DMT2

Com o interesse de averiguar a existência de uma fonte salivar que fosse responsável pelo maior número de proteínas alteradas na DMT2 e, deste modo, identificar se existe um tipo de glândula salivar mais comprometida nesta patologia, as proteínas salivares alteradas foram catalogadas de acordo com as fontes de produção (Figura 5). Contudo, como no estudo de Rao *et al* 2009 a recolha de saliva foi realizada através de bochechos não sendo, portanto, recolhidas amostras de glândulas específicas, todas as proteínas alteradas da DMT2 (Tabela 1) que não se encontravam depositadas no OralCard foram identificadas como fazendo parte da saliva total. Para as proteínas já depositadas no OralCard foi possível atribuir uma fonte de produção (Figura 5)

Swiss-Prot accession	protein name	diabetes vs control	
		fold change	p-value
P23280	Carbonic anhydrase 6	3.84	<0.0001
P14618	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	3.47	0.0002
P06737	Glycogen phosphorylase, liver form	3.32	0.0105
Q549C7	Transthyretin	2.4	0.0246
P22894	Neutrophil collagenase	2.36	0.0039
P00491	Purine nucleoside phosphorylase	-2.08	0.0032
O60235	Transmembrane protease, serine 11D	-2.13	0.012
P30838	Aldehyde dehydrogenase, dimeric NADP-preferring	-2.19	0.0034
Q13231-3	Isoform 2, 3 and 4 of Chitotriosidase-1	-2.2	0.0263
Q9UBR2	Cathepsin Z	-2.85	0.0361
P00558	Phosphoglycerate kinase 1	-3.18	<0.0001
O60218	Aldo-keto reductase family 1 member B10	-3.32	0.0127
Q13787	Apolipoprotein B-100	-4.13	<0.0001
P00915	Carbonic anhydrase 1	-4.36	<0.0001
P00918	Carbonic anhydrase 2	-5.54	0.0002
Q86U62	Proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 7	-6.11	0.0184
P27824	Calnexin	-7.74	0.0005
Q6FHH3	Uteroglobin	10.43	<0.0001
Q4VAX6	Serpin peptidase inhibitor, clade B	6.05	0.0101
Q9NP55	Protein Plunc	5.48	<0.0001
P13671	Complement component C6	4.75	0.036
P01009	Alpha-1-antitrypsin	3.24	<0.0001
P01034	Cystatin-C	2.22	0.0007
P30740	Leukocyte elastase inhibitor	2.03	0.011
P01040	Cystatin-A	-2.42	0.0042
P04083	Annexin A1	-3.57	<0.0001
Q4VB24	Histone cluster 1, H1e	6.05	0.0101
Q09666	Neuroblast differentiation-associated protein AHNAK	3.08	0.0472
Q9NZT1	Calmodulin-like protein 5	-2.17	0.0151
Q01469	Fatty acid-binding protein, epidermal	-2.55	<0.0001
Q06830	Peroxiredoxin-1, -2 and -6	-2.59	<0.0001
Q96RM1	Small proline-rich protein 2F	-2.85	0.0361
P31151	Protein S100-A7	-2.94	0.003
Q5TCI8	Lamin A/C	-3.26	<0.0001
P07355	Annexin A2	-4.25	0.0014
P15924	Desmoplakin	-5.88	<0.0001
P30043	Flavin reductase	-6.11	0.0003
P07998	Ribonuclease pancreatic	3.78	0.0015
A2RTY6	Interalpha (Globulin) inhibitor H2	3.16	0.0102
P19827	Interalpha-trypsin inhibitor heavy chain H1	2.8	0.0042
P36222	Chitinase-3-like protein 1	2.65	0.0173
Q14624	Interalpha-trypsin inhibitor heavy chain H4	2.59	0.006
P80303	Nucleobindin-2	2.05	0.005
Q9UKR3	Kallikrein-13	-4.48	0.0265
O43240	Kallikrein-10	-4.99	0.0024
Q7M4Q5	Basic proline-rich peptide IB-8a	5.4	0.019
P39687	Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family	3.32	0.0105
Q5VY30	Retinol binding protein 4, plasma	2.15	0.0143
P23528	Cofilin-1	2.11	0.0464
P62258	14-3-3 protein epsilon	-2.25	0.01
P12429	Annexin A3	-2.68	0.008
Q04917	14-3-3 protein eta	-2.95	0.0438
O15511	Actin-related protein 2/3 complex subunit 5	6.05	0.0101
P60953-2	Isoform 2 of P60953 Cell division control protein 42 homologue precursor	4.75	0.036
P01023	Alpha-2-macroglobulin	2.23	<0.0001
P28676	Grancalcin	-7.09	0.0083
P61160	Actin-like protein 2	3.36	0.0476
P26038	Moesin	2.04	0.0006
O95274	Ly6/PLAUR domain-containing protein 3	-2.3	0.0236
P67936-2	Isoform 2 of P67936 Tropomyosin alpha-4 chain	-3.75	0.0006

Tabela 1: Proteínas salivares em quantidade significativamente aumentada ou diminuída* em indivíduos com DMT2 em relação ao grupo de controle

*p-value ≤ 0,05 e fold ± 2.0 pelo menos

Adaptado de Rao et al 2009

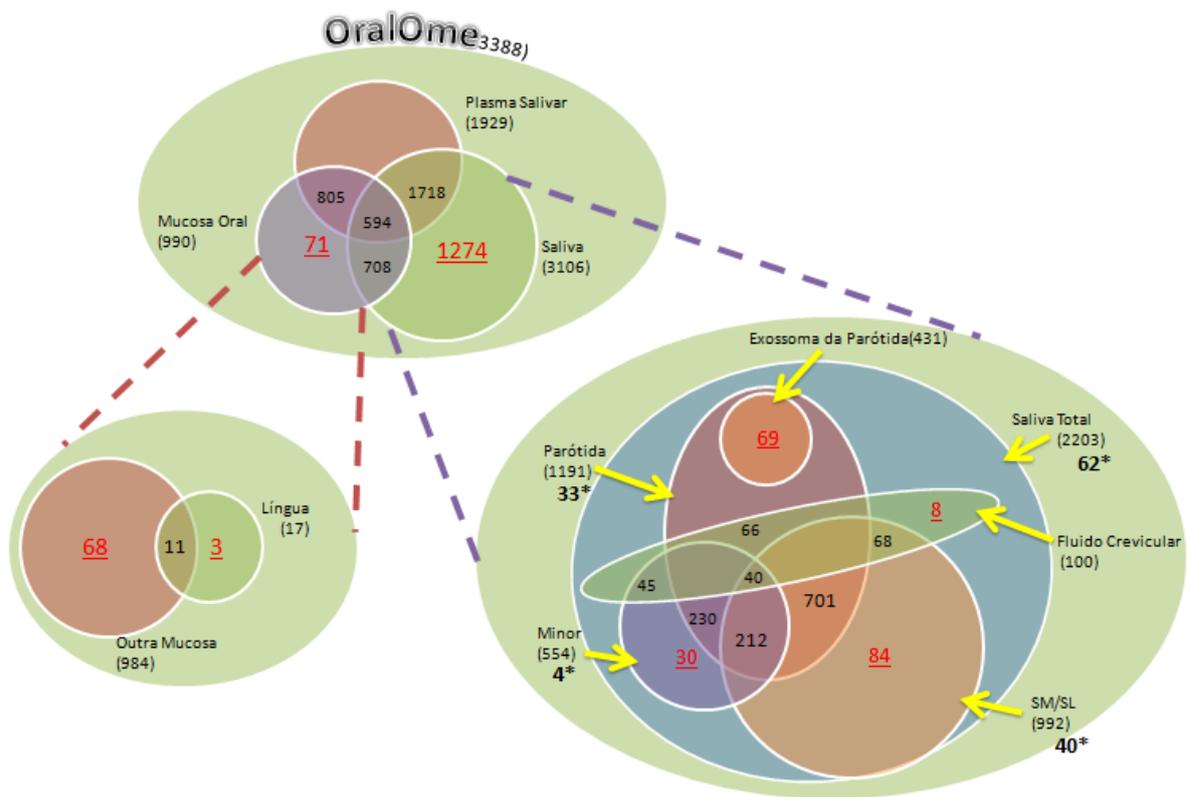


Figura 5: Diagrama representativo das fontes de produção salivar das proteínas que se encontram depositadas no OralCard.

* quantidade de proteínas salivares alteradas na DMT2 cuja presença está identificada nessa fonte

No gráfico representado na Figura 6, é possível comparar a quantidade de proteínas salivares alteradas na DMT2 relativamente à sua fonte de produção.

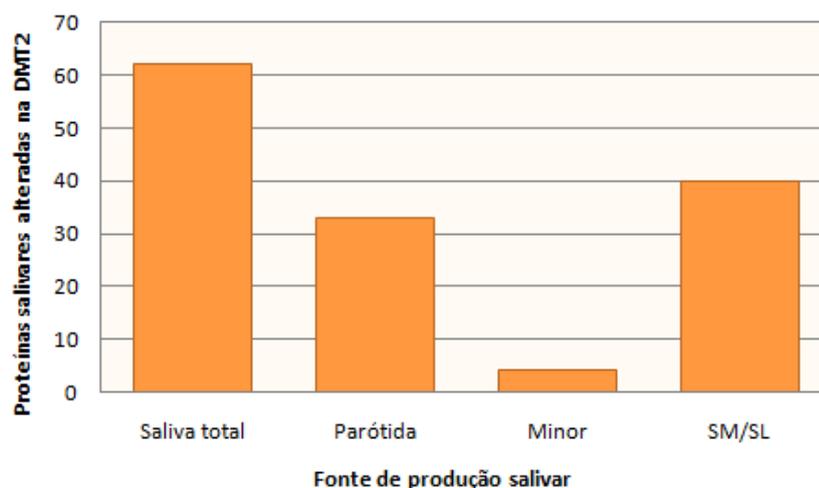


Figura 6: Gráfico representativo do nº total de proteínas alteradas na DMT2 por glândula de acordo com os resultados de Rao *et al* 2009.

Adaptado de Rao et al 2009

A partir da análise do gráfico da Figura 6, verifica-se que existe uma maior quantidade de proteínas alteradas produzidas pelas glândulas Submandibulares/Sublinguais (SM/SL). Tal facto não significa que essas proteínas sejam exclusivamente produzidas por essas glândulas, pois verificou-se que todas as proteínas já depositadas no OralCard tinham mais do que uma fonte de produção.

4.3 Vias de sinalização em que participam as proteínas salivares alteradas na DMT2

No sentido de identificar que funções moleculares se encontram comprometidas na DMT2, as proteínas salivares alteradas foram catalogadas de acordo com a ontologia do PANTHER - “Vias de Sinalização” (Mi 2010, Thomas 2003) e com essa informação foi gerado um gráfico (Figura 7) que permite identificar quais as vias de sinalização alteradas.

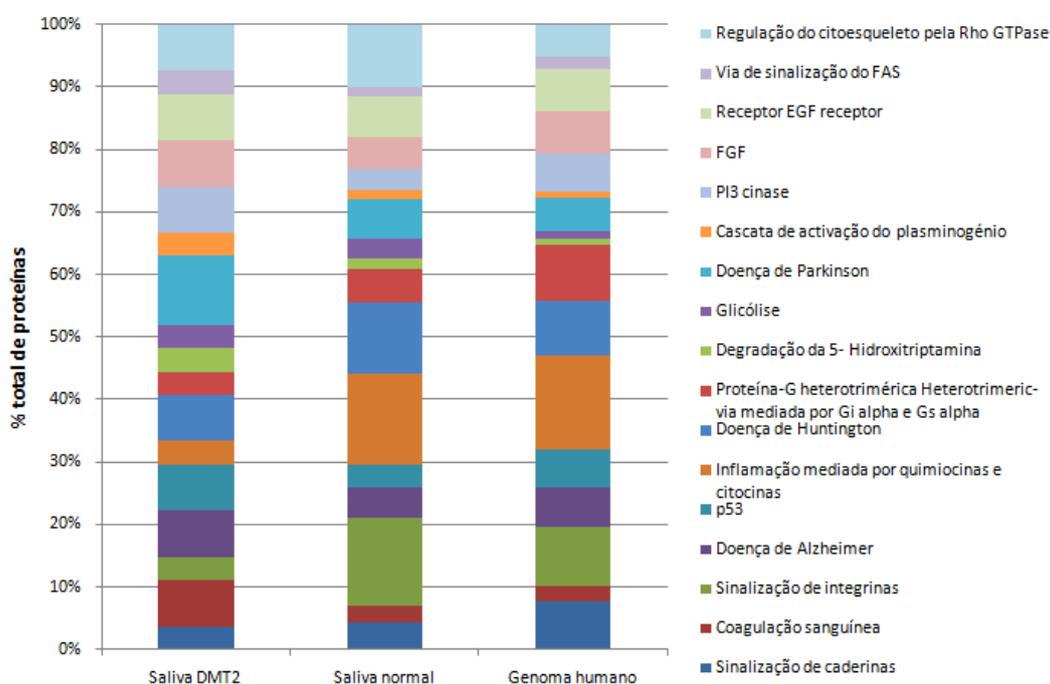


Figura 7: Gráfico representativo da percentagem de proteínas da saliva alteradas na DMT2 em cada via de sinalização, em relação ao que seria de esperar no “estado de saúde” representado pelas proteínas do OralCard na ausência de patologia sistémica (Saliva normal) e do total de proteínas humanas (Genoma humano).

Adaptado da ferramenta PANTHER (Mi 2010, Thomas 2003)

Os resultados expressos na Figura 7 permitem comparar a percentagem de proteínas alteradas com as de paciente saudável (tendo como referência de “estado saúde” as proteínas do OralCard que não estão associadas a patologia sistémica - saliva normal) e com as proteínas do genoma humano (total de proteínas humanas conhecidas). Pela análise do gráfico da Figura 7 destacam-se com relevância para a DMT2, alterações na via da coagulação sanguínea e na via de activação do plasminogénio, nas quais estão envolvidas percentagens significativamente aumentadas de proteínas salivares alteradas. Também o aumento de proteínas alteradas na via da apoptose (sinalização por FAS) retrata o forte comprometimento de mecanismos de integridade celulares que estão alterados na DMT2.

4.4 Avaliação das funções moleculares em que participam as proteínas salivares alteradas na DMT2

Após terem sido avaliadas as vias de sinalização que se encontram alteradas na DMT2, tornou-se relevante avaliar com mais detalhe quais as funções moleculares que se encontram comprometidas na DMT2 com o objectivo de melhor se compreender a DMT2 à escala molecular. Nesse sentido, as proteínas do proteoma salivar determinado por Rao *et al* 2009 (tabela 1) foram organizadas de acordo com a ontologia – “Função Molecular”, utilizando a ferramenta PANTHER (Mi 2010, Thomas 2003). A organização das proteínas segundo a função molecular permite inferir quais as actividades molecular se encontram comprometidas na patologia.

Pela análise do gráfico da função molecular representado na Figura 8, verificou-se que existe uma quantidade significativamente superior de proteínas envolvidas em duas funções moleculares específicas: actividade catalítica e função de ligação (*binding*).

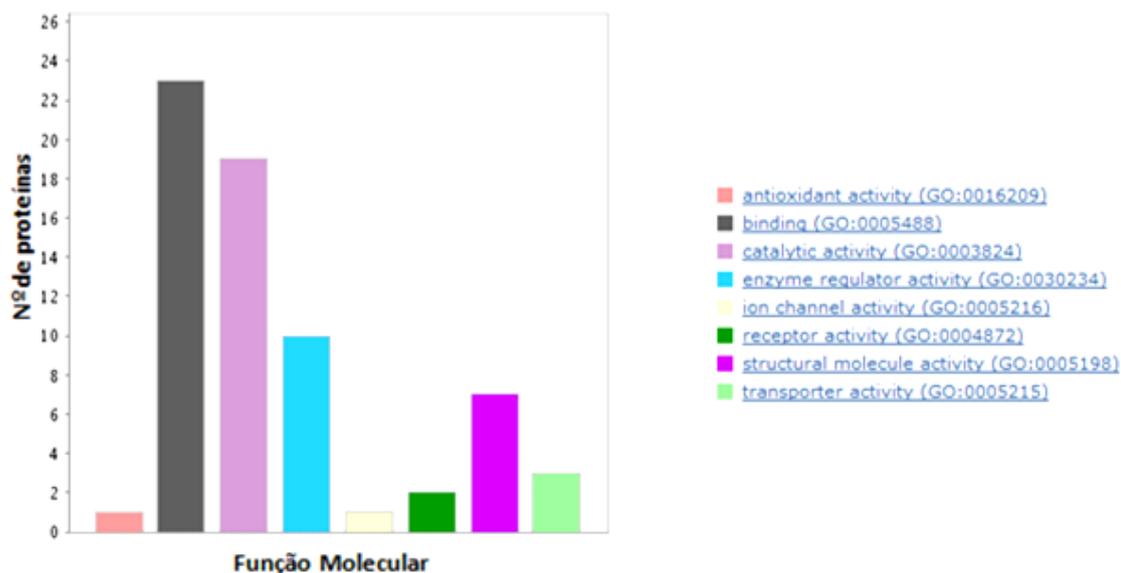


Figura 8: Gráfico representativo da quantidade de proteínas salivares alteradas na DMT2, envolvida em cada função molecular identificada pela cor específica constante na legenda da figura.

Adaptado da ferramenta PANTHER (Mi 2010, Thomas 2003)

Todas as proteínas envolvidas nas duas funções moleculares mais representativas, função de ligação e de atividade catalítica, foram re-organizadas e catalogadas em sub-categorias da ontologia “Função Molecular”, no sentido de avaliar se estariam envolvidas, simultaneamente, em diferentes funções moleculares. Para esse efeito, foi gerado o gráfico representado na Figura 9.

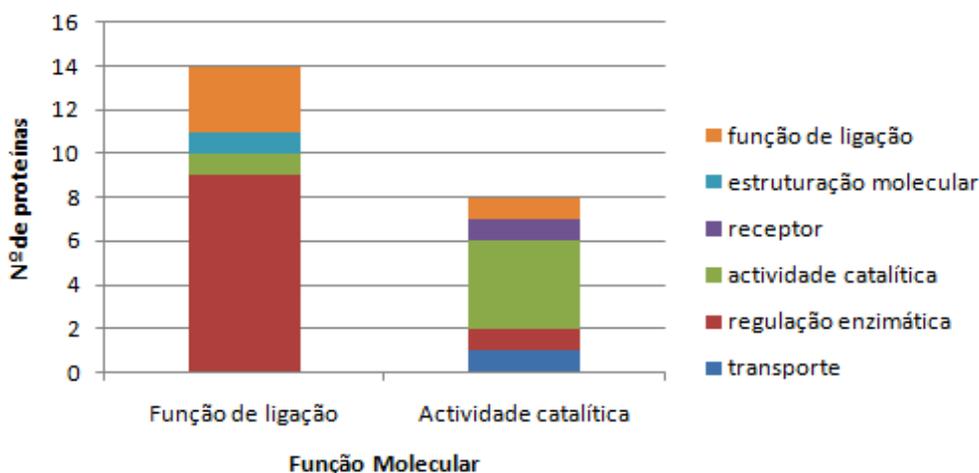


Figura 9: Gráfico representativo da quantidade de proteínas alteradas na DMT2 envolvidas nas funções de ligação e atividade catalítica e que foram organizadas em sub-categorias da “Função Molecular”.

Adaptado da ferramenta PANTHER (Mi 2010, Thomas 2003)

Como é possível verificar no gráfico gerado (Figura 9), muitas das proteínas envolvidas na função de ligação estão envolvidas noutras funções, sendo a de regulação enzimática aquela que envolve um maior número de proteínas com quantidades alteradas. Idêntica situação se verifica para as proteínas envolvidas na actividade catalítica no entanto a maior parte delas está envolvida principalmente na função específica de actividade catalítica. Esta análise permite identificar que na DMT2 existem proteínas envolvidas em actividade catalítica e regulação de actividade catalítica que estão alteradas.

4.5 Identificação das vias de sinalização em que estão implicadas as proteínas salivares alteradas com função de regulação enzimática e de ligação

Das proteínas envolvidas na função de ligação, um maior número delas possui também uma função de regulação enzimática. As proteínas com a função de regulação enzimática, como por exemplo inibidores ou reguladores alostérios de actividades enzimáticas, desempenham papéis essenciais no funcionamento celular.

No sentido de serem identificadas quais as vias de sinalização em que participam as proteínas alteradas com actividade de regulação enzimática, foi gerado um gráfico de acordo com a ontologia “Vias de Sinalização” utilizando a ferramenta PANTHER (Mi 2010, Thomas 2003).

O gráfico da Figura 10 evidencia que todas as proteínas alteradas com função molecular de actividade catalítica e de ligação (como reguladores de actividade enzimática) pertencem às vias de sinalização que regulam a coagulação sanguínea.

A organização das proteínas alteradas na DMT2 de acordo com as ontologias PANTHER já descritas permitiu restringir o universo em estudo e identificar quais as proteínas alteradas identificadas na coagulação sanguínea. Nessa via estão presentes duas proteínas, a alfa-2-macroglobulina (A2M) e a alfa-1-antitripsina (SERPINA1), que são inibidores de proteinases serínicas, enzimas que desempenham funções fundamentais, na regulação da cascata de coagulação sanguínea.

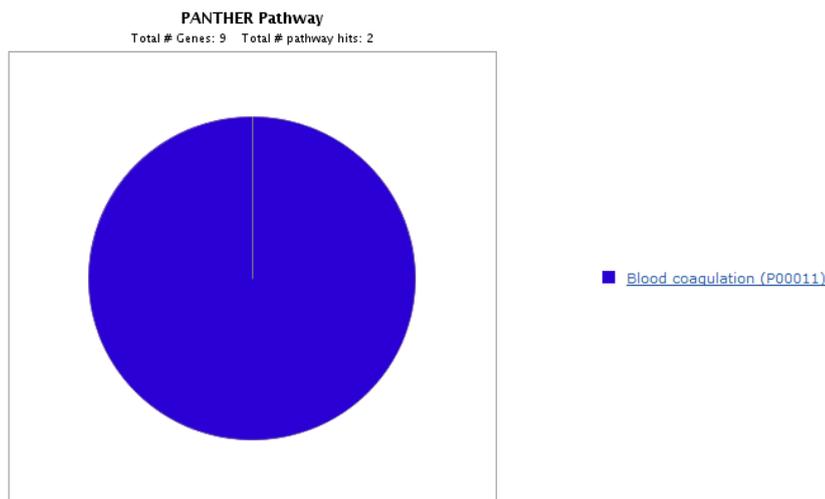


Figura 10: Gráfico das vias de sinalização em que se encontram as proteínas alteradas na DMT2 envolvidas na função de regulação enzimática (comuns à função de ligação).

Adaptado da ferramenta PANTHER (Mi 2010, Thomas 2003)

4.6 Estudo das proteínas salivares alteradas na DMT2 implicadas na via da coagulação sanguínea

Como foi descrito na introdução desta dissertação, o processo de coagulação sanguínea na DMT2 encontra-se comprometido. A análise do proteoma salivar da DMT2 obtido por Rao *et al* 2009, permitiu verificar que de facto, existe uma alteração significativa de proteínas reguladoras da coagulação sanguínea (Figura 7 e Figura 10).

Com o intuito de analisar se as interacções proteína-proteína estabelecidas pela A2M e SERPINA1 são realizadas com proteínas que também estão presentes na saliva utilizou-se a ferramenta STRING.

A Figura 11 mostra a rede de interacções moleculares estabelecidas com várias proteínas da saliva e que estão envolvidas na coagulação sanguínea, nomeadamente com a trombina (F2) e a caliceína plasmática (KLKB1). A A2M tem estabelecidas relações já identificadas em bases de dados e descritas em bibliografia com a F2 e com a KLKB1 e a SERPINA1 tem também relações descritas na bibliografia com as mesmas proteínas (Van Der Graaf *et al* 1983, Boer *et al* 1993), apesar de na rede de interacções

moleculares gerada pela ferramenta STRING ainda não ter sido anotada uma relação entre este inibidor e a KLKB1.

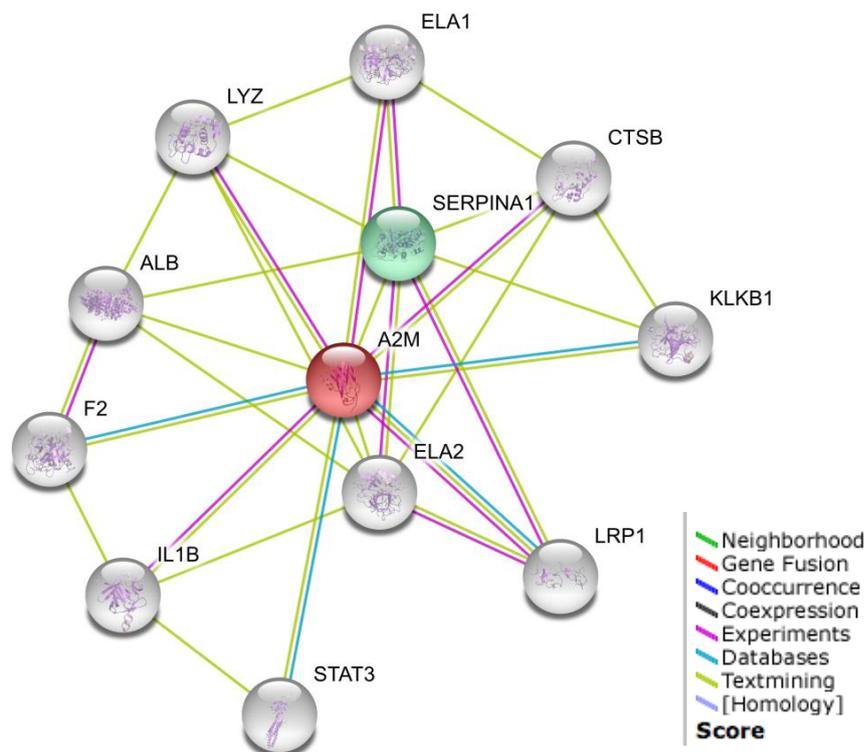


Figura 11: Representação da rede de interacções proteína-proteína em que participam os inibidores A2M e SERPINA1 com outras proteínas presentes na saliva. (limite de 10 interacções com média confiança).

A2M= alfa-2-macroglobulina; ALB= albumina; CTSB= catepsina B; ELA1= elastase 1; ELA2= elastase 2; F2= trombina; IL1B= interleucina 1 beta; KLKB1= calicreína plasmática; LRP1= receptor de lipoproteína de baixa densidade relacionado com proteína 1; SERPINA1= alfa-1-antitripsina; STAT3= transdutor de sinal e activador da transcrição 3

Adaptado da ferramenta STRING (Szklarczyk *et al* 2011)

Segundo o artigo de Rao *et al* 2009 tanto a A2M como a SERPINA1, inibidores de proteases séricas que desempenham um papel regulador decisivo na coagulação/fibrinólise, encontram-se em quantidades aumentadas na saliva do indivíduo com DMT2. Outros estudos referem também que a A2M e a SERPINA1 se encontram em quantidade aumentada no plasma do diabético (Hashemi *et al* 2007, Phadke *et al* 1998). Isto poderia levar-nos a concluir que, estando em quantidade aumentada, a sua função estaria a ser amplamente exercida: o que levaria a uma maior inibição das proteases da coagulação F2 e KLKB1. Deste modo, a cascata da coagulação estaria a ser fortemente inibida o que, por sua vez, poderia estar associado a dificuldades na cicatrização. Mas, como já foi referido, o paciente com DMT2 apresenta um estado de

hipercoagulação (Mafrici et al 2010), tendo sido identificados vários elementos da cascata da coagulação com quantidades alteradas, como é possível verificar na Figura 12.

Na tabela 2 são apresentadas as proteínas e células alteradas na DMT2, de acordo com a actual informação disponível. É de salientar que tanto a calicreína plasmática (KLKB1) como a trombina (F2), apesar de não terem sido identificadas no estudo de Rao *et al* 2009 (Tabela 1), se encontram aumentadas no plasma do paciente com DMT2 (Grant 2007) o que provavelmente também deverá reflectir-se na saliva. Sendo assim, é perfeitamente admissível considerarmos que estas proteases serínicas não estão a ser inibidas apesar de uma maior quantidade de inibidores presentes, justificando o estado de hipercoagulação na DMT2.

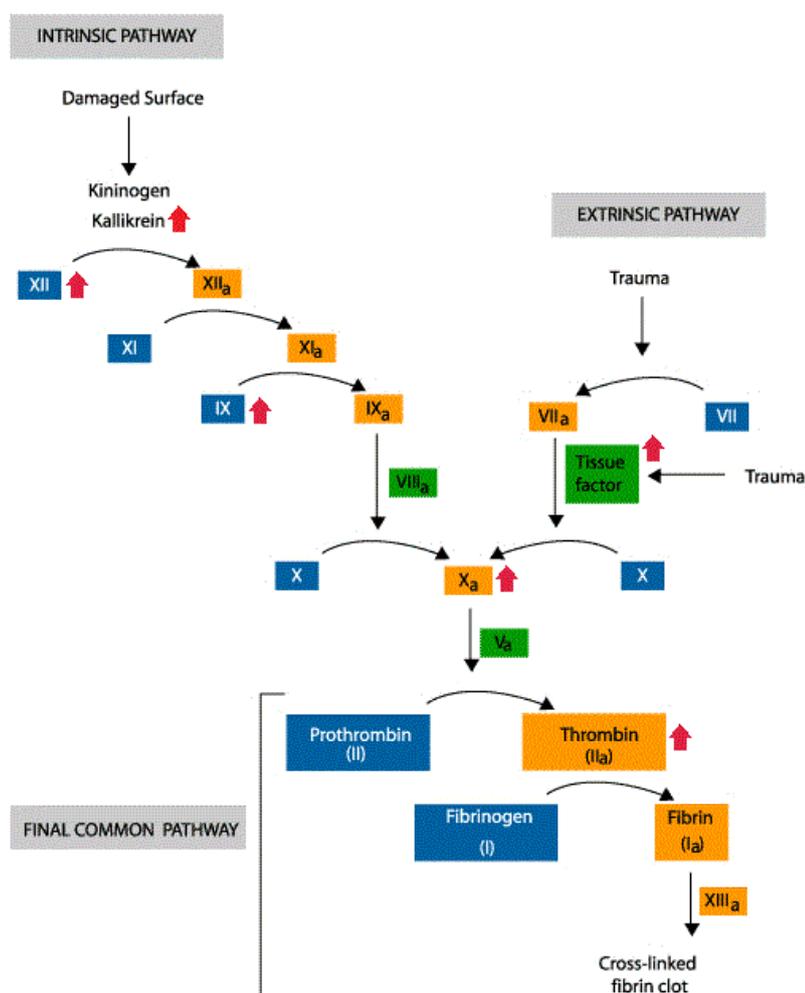


Figura 12: Diagrama representativo da cascata da coagulação sanguínea na DMT2 com proteínas com concentração plasmática aumentada, de acordo com a bibliografia documentada na tabela 2.

↑ = aumento da concentração plasmática da proteína

Adaptado de Bombeli et al 2004

A.

Proteína	Alteração	Referência
A2M	↑ da concentração	Rao et al 2009, Hashemi et al 2007, Phadke et al 1998
Adipocina	↑ da síntese	Bansilal et al 2007
Adiponectina citocina	↑ da síntese	Bansilal et al 2007
AGE	↑ da acumulação nos tecidos	Toth et al 2008
Angiotensina II	↑ da concentração	Kamgar et al 2006
Antitrombina III	↓ da concentração	Grant 2007
Caliceína	↑ da concentração	Grant 2007
Capases	↑ da actividade	Al-Mashat et al 2006
Citocinas	expressão desregulada	Al-Mashat et al 2006
Colagénio	↓ da síntese	Thomson et al 2010
Factor IX	↑ da concentração	Grant 2007
Factor plaquetário 4	↑ da síntese	Stratmann et al 2005
Factor tecidual	↑ da síntese	Mafrici et al 2010, Jansson 2007
Factor VI	↑ da concentração	Grant 2007
Factor Xa	↑ da síntese pelas plaquetas	Stratmann et al 2005
Factor XII	↑ da concentração	Grant 2007
Factores de crescimento	↓ da concentração	Loot et al 2002
Fibrinogénio	↑ da síntese	Stratmann et al 2005, Grant 2007
Fibrinopeptídeo A	↑ da concentração	Grant 2007
Fragmento 1 e 2 da protrombina	↑ da concentração	Grant 2007
IL-1	↑ da síntese	Jansson 2007
IL-6	↑ da síntese	Bansilal et al 2007, Jansson 2007
IL-8	↑ da síntese	Jansson 2007
Leptina	↑ da síntese	Bansilal et al 2007
MMP's	expressão desregulada	Trengove et al 1999
PAI-1	↑ da síntese	Bansilal et al 2007, Jansson 2007, Stratmann et al 2005
PDGF	↑ da síntese	Stratmann et al 2005
Plasmina	↓ da produção	Dunn et al 2006
Proteína C	↓ da concentração	Grant 2007
PSY12	↑ do sinal mediado por este receptor	Angiolillo et al 2008
RAGE	↑ da expressão	Goova et al 2001
Resisitina	↑ da síntese	Bansilal et al 2007
SERPINA1	↑ da concentração	Rao et al 2009, Hashemi et al 2007, Phadke et al 1998
TGF-β	↑ da síntese	Stratmann et al 2005
TNF-α	↑ da síntese	Bansilal et al 2007
tPA	↓ da concentração	Dunn et al 2006
Trombina	↑ da síntese pelas plaquetas	Stratmann et al 2005
Trombomodulina	↓ da síntese	Mafrici et al 2010
Tromboxano A2	↑ da síntese	Stratmann et al 2005
VEGF	↑ da síntese	Stratmann et al 2005
vWF	↑ da síntese	Stratmann et al 2005, Grant 2007

B.

Célula	Alteração	Referência
Fibroblastos	↓ do factor de expressão tecidual	Chen et al 2005
	↓ da capacidade migratória	Lobman et al 2006
	função secretora anormal	Lobman et al 2006
	diferenciação tardia em miofibroblastos	Peppas et al 2009
Macrófagos	função modificada	Thomson et al 2010
Plaquetas	↑ das dimensões	Stratmann et al 2005
	↑ adesividade	Winocour et al 1992
	↑ da tendência para agregação espontânea	Winocour et al 1992
Queratinócitos	↓ do factor de expressão tecidual	Chen et al 2005
	↓ da proliferação	Lobman et al 2006
	alterações na morfologia e diferenciação	Lobman et al 2006

Tabela 2: (A) Lista de proteínas alteradas na DMT2; (B) Células alteradas na DMT2.

4.7 Glicosilação não enzimática de inibidores de proteases serínicas

O facto dos inibidores A2M e SERPINA1 parecerem não estar a realizar a sua função, apesar de estarem em quantidade superior ao normal, pode estar relacionado com o processo de glicosilação não enzimática o qual ocorre em condições de hiperglicemia, como acontece na DMT2, conduzindo a uma alteração de função. Se a função normal de inibidores de proteases for alterada, a regulação da proteólise indesejada não é conseguida (Phadke *et al* 1998).

No estudo de Hashemi *et al* 2007, os autores avaliaram a capacidade inibitória da SERPINA1 em pacientes diabéticos insulino-dependentes e não insulino-dependentes. Em ambos os grupos se verificou uma menor capacidade inibitória em relação a pacientes saudáveis. Os autores referem que o mecanismo de diminuição da função da SERPINA1 na DMT2, apesar da existência de uma maior quantidade deste inibidor, pode estar relacionado com a glicosilação não enzimática.

Para avaliar se, teoricamente, estas proteínas podem sofrer glicosilações não enzimáticas, recorreu-se à utilização das ferramentas informáticas UniProtKB (onde estão registadas as características estruturais das proteínas) e PyMOL (gera a estrutura tridimensional da proteína, com sequência obtida através do UniProtKB) para evidenciar a existência de locais, na SERPINA1, capazes de sofrer glicosilação não enzimática.

Nos locais de glicosilação não enzimática, os açúcares redutores ligam-se a átomos de nitrogénio da proteína. Esses átomos podem pertencer tanto ao N-terminal da proteína como a cadeias laterais de resíduos dos aminoácidos lisina e histidina que se encontram à superfície da mesma (The UniProt Consortium 2011), uma vez que a glicosilação não enzimática se realiza após o enrolamento estrutural da proteína. Através da ferramenta PyMOL foi possível confirmar a presença de locais de glicosilação não enzimática na SERPINA1, que apresenta vários aminoácidos lisina e histidina à sua superfície (Figura 13). Além disso, possibilitou a representação da estrutura da SERPINA1 ligada a um substrato, tripsina, permitindo a visualização de aminoácidos passíveis de glicosilação não enzimática (Figura 13), confirmando-se assim que esta proteína pode ser glicosilada em domínios envolvidos na ligação com o local activo da enzima e que, deste modo, a sua função como inibidor é comprometida.

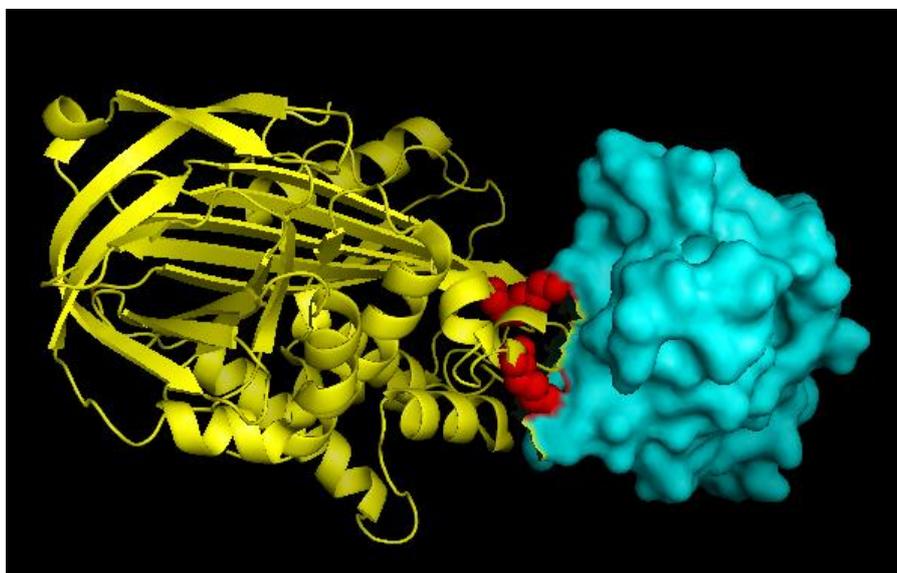


Figura 13: Representação da estrutura tridimensional da SERPINA1 (amarelo), ligada à tripsina (azul). As esferas vermelhas na zona de ligação das duas proteínas representam aminoácidos lisina nos quais é possível ocorrer glicosilação não enzimática.

Gerado pela ferramenta PyMOL (PyMOL 2008), com sequência através do UniProtKB (The UniProt Consortium 2011)

Quanto à A2M, o estudo de Hashemi *et al* 2007 refere que esta proteína tem uma capacidade inibitória diminuída na DMT2 apesar de se encontrar em quantidade aumentada, o que pode também estar relacionado com a glicosilação não enzimática tal como já foi referido para a SERPINA1. Contudo, como a A2M ainda não tem a sua estrutura tridimensional determinada por estudos de cristalografia de raios X, não foi possível gerar um modelo da sua estrutura tridimensional o que, conseqüentemente, não permitiu identificar a presença de locais de glicosilação não enzimática na superfície da proteína. Pela razão apontada serão necessários mais estudos experimentais da A2M, que comprovem a possibilidade de sofrer glicosilação não enzimática que justifique a diminuição da sua função. O facto de ambas se encontrarem em concentrações elevadas na saliva pode resultar de um mecanismo compensador para a diminuição da sua função inibitória. No entanto, serão necessários estudos experimentais para validar esta hipótese.

Sendo assim, a inibição da F2 (trombina) e da KLKB1 (caliceína) pela SERPINA1 não está a decorrer e portanto estas proteínas continuarão a exercer a sua função: um aumento da activação do factor XII e auxílio na conversão de plasminogénio em plasmina por parte da KLKB1 (Figura 14), e aumento da formação de trombina, catalisando a reacção de transformação do fibrinogénio em fibrina.

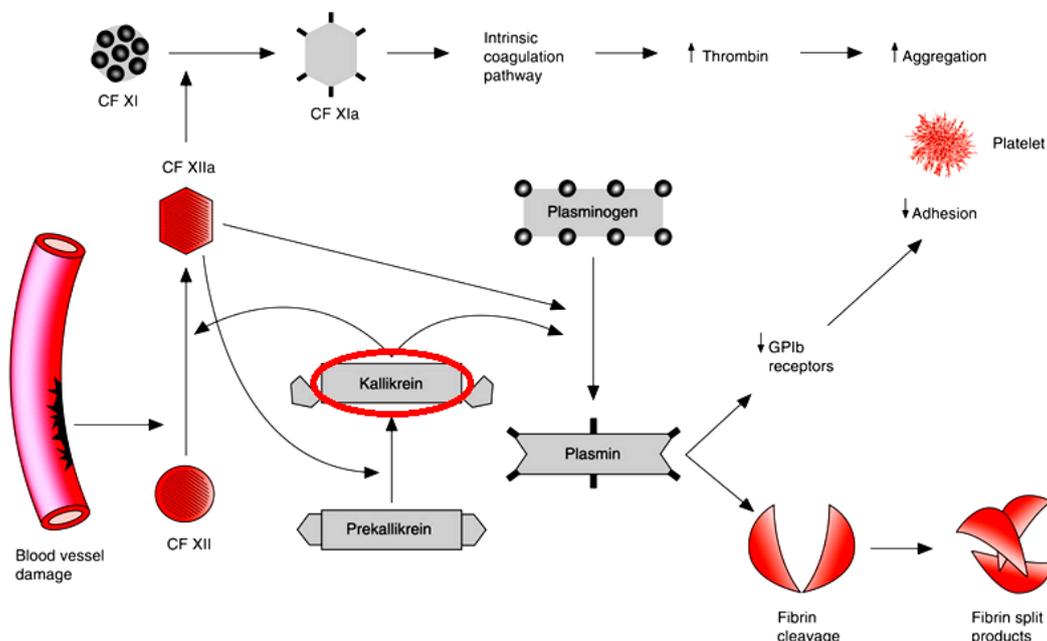


Figura 14: Diagrama representativo da via intrínseca da coagulação e fibrinólise, em que é possível verificar a acção da KLKB1 (Kallikrein) a dois níveis: activação do factor XII e do plasminogénio.

CF= Factor de coagulação; GPIb= Glicoproteína Ib

Adaptado de Eubanks 2010

Este acréscimo na produção de trombina leva a uma maior conversão do fibrinogénio de modo a formar o coágulo de fibrina. Este facto pode contribuir para o estado de hipercoagulação que se sabe existir na DMT2, envolvendo um risco acrescido para o desenvolvimento de um estado pró-trombótico.

4.8 Dissolução do coágulo de fibrina na DMT2

Como já foi referido, a KLKB1 é uma das proteases serínicas que permite a geração de plasmina a partir do plasminogénio (Figura 14) . A plasmina é também uma protease serínica responsável pelo processo de fibrinólise, clivando a rede do coágulo de fibrina originando fragmentos de fibrina que são eliminados por outras proteases ou pelos rins e fígado. O processo de fibrinólise, ao permitir a eliminação dos coágulos de fibrina, protege o nosso organismo contra os riscos de formação de trombos e, no caso de uma ferida depois de esta ter cicatrizado, a fibrinólise permite destruir o coágulo sanguíneo que tinha inicialmente impedido a hemorragia.

O facto de a inibição da calicreína plasmática pela A2M e pela SERPINA1 estar reduzida, poderia indicar que estaria a promover mais amplamente a formação de plasmina, originando um estado de maior fibrinólise. No entanto, como já foi referido, o paciente diabético apresenta um estado de hipofibrinólise, o que contribui ainda mais (além do estado de hipercoagulação) para uma predisposição a acidentes trombóticos (Mafri et al 2010). Além disso, estudos como o de Dunn *et al* 2006 referem que no paciente com DMT2 a produção de plasmina se encontra reduzida.

Esta aparente discrepância, pode estar relacionada com o facto de, como já foi referido, na DMT2 existir um aumento da concentração sanguínea do inibidor do activador de plasminogénio do tipo 1 (PAI-1) (Grant *et al* 2005): maior inibição do activador tecidual do plasminogénio (tPA) que catalisa a conversão de plasminogénio em plasmina (Figura 15), levando assim a um estado de hipofibrinólise (Dunn *et al* 2006). Apesar de o PAI-1 não se encontrar depositado no OralCard (proteínas da cavidade oral) este aumento da sua concentração sanguínea na DMT2 deverá reflectir-se na saliva. Neste sentido, serão necessários mais estudos para avaliar a acção do PAI-1 nesse fluído.

Para reforçar este efeito de hipofibrinólise, segundo Grant 2007 a glicosilação não enzimática do fibrinogénio leva à formação de filamentos de fibrina mais finos mas mais fortemente entrelaçados, criando uma estrutura mais densa e, portanto, mais resistente a acções fibrinolíticas.

O estudo do proteoma salivar da DMT2 permitiu identificar inibidores de proteases serínicas presentes na saliva de pacientes com a patologia, cuja função está comprometida. Como estes inibidores estão envolvidos na regulação do processo de coagulação, a sua função anormal origina uma perturbação na formação do coágulo de fibrina e na sua fibrinólise.

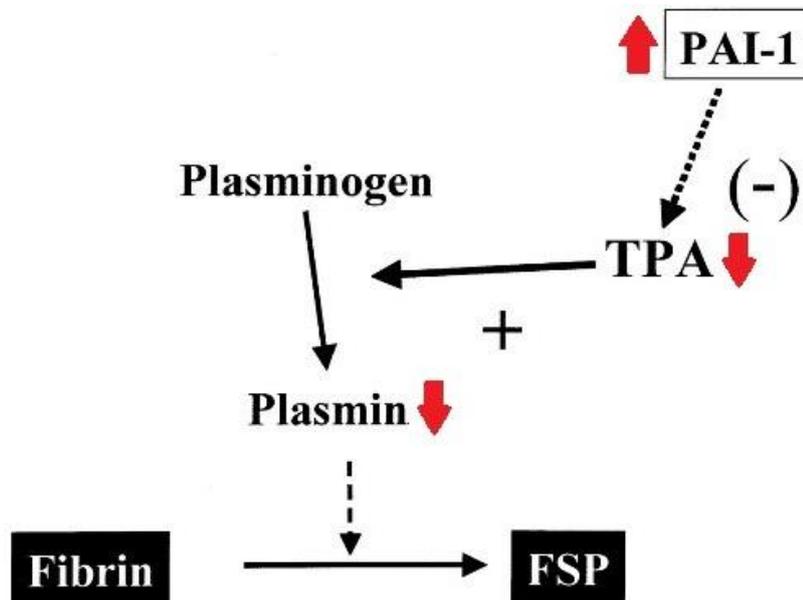


Figura 15: Diagrama representativo do estado de hipofibrinólise característico da DMT2.

↓ = diminuição da concentração plasmática da proteína; ↑ = aumento da concentração plasmática da proteína; FSP = produtos de degradação da fibrina; tPA= activador tecidual do plasminogénio; PAI-1= inibidor do activador do plasminogénio do tipo 1

Adaptado de Calles-Escandon et al 2001

Os sistemas de coagulação e fibrinolítico estão directamente associados ao processo de cicatrização, e esta maior tendência à formação do coágulo de fibrina (não inibição da trombina e da calicreína pela SERPINA1 glicosilada), resistente à fibrinólise (Grant 2007), bem como a menor produção de plasmina (aumento do PAI-1) que origina o estado de hipofibrinólise, poderão estar relacionados com a dificuldade de cicatrização na DMT2. De facto, no sentido de alterar este estado de hipofibrinólise na

DMT2, o artigo de Chan *et al* 2001 refere que uma redução da função do PAI-1 resultaria no melhoramento do processo de cicatrização.

5. Conclusão

O recurso de ferramentas bioinformáticas permitiu analisar os resultados do proteoma salivar da DMT2 e inferir as implicações que proteínas alteradas identificadas na saliva de pacientes diabéticos pudessem ter nesta patologia nomeadamente na coagulação sanguínea e fibrinólise, dois eventos envolvidos no processo de cicatrização que se encontra comprometido, com implicações na saúde oral destes pacientes.

Foi possível identificar as fontes de produção de proteínas salivares alteradas na DMT2 e verificou-se que existem inibidores de proteases envolvidos no mecanismo de coagulação sanguínea, A2M e SERPINA1, que se encontram presentes na saliva do paciente diabético em quantidades aumentadas, apesar de a sua função se encontrar comprometida. Foi possível verificar que esses inibidores podem ter a sua função diminuída devido a glicosilações não enzimáticas em domínios de ligação à protease como se confirmou para a SERPINA1. A redução da função da A2M e da SERPINA1 pode contribuir para o estado de hipercoagulação característico da DMT2.

Conclui-se que, apesar dos níveis de actividade reduzidos da A2M e da SERPINA1 poderem levar a uma maior actividade da KLKB1 e, assim, melhorar o processo de fibrinólise através da geração de plasmina, a bibliografia descreve um estado de hipofibrinólise no diabético bem como uma menor produção de plasmina. Apesar do aumento de PAI-1 que ocorre na DMT2 parecer ser a explicação para este facto, serão necessários estudos experimentais para validar estas hipóteses. Todos os factos descritos relativamente à fibrinólise no diabético poderão estar associados à dificuldade de cicatrização característica da DMT2.

Com o presente trabalho demonstra-se o potencial dos estudos *in silico* para a avaliação e integração da vasta informação experimental e bibliográfica existente. Com as evidências demonstradas em relação aos inibidores A2M e SERPINA1 estes dois inibidores poderão vir a ser validados experimentalmente constituindo-se como possíveis biomarcadores salivares com interesse na intervenção terapêutica, clínica e de diagnóstico.

6. Bibliografia

1. A.D.A (The American Diabetes Association); Standards of Medical Care in Diabetes – 2011. *Diabetes Care*. Volume 34 (Suppl1). 2011
2. Al-Mashat H. *et al.*; Diabetes enhances mRNA levels of proapoptotic genes and caspase activity, which contribute to impaired wound healing. *Diabetes*. 55: 487–95. 2006
3. Angiolillo, D. *et al.*; A randomized study assessing the impact of cilostazol on platelet function profiles in patients with Diabetes mellitus and coronary artery disease on dual anti-platelet therapy: results of the OPTIMUS-2 study. *Eur Heart J*; 29: 2202–11. 2008
4. Azuaje, F.; Bioinformatics and Biomarker Discovery- “omic” data analyses for personalized medicine. *John Wiley & Sons, Ltd*. Ed.1. 2010
5. Bansilal, S. *et al.*; Role of insulin resistance and hyperglycemia in the development of atherosclerosis. *Am J Cardiol*; 99: 6B-14B. 2007
6. Barazzoni, R. *et al.*; Insulin acutely increases fibrinogen production in individuals with type 2 Diabetes but not in individuals without Diabetes. *Diabetes*; 52: 1851-6. 2003
7. Beikler, T.; Flemmig, T.; Implants in the medically compromised patient. *Crit Rev Oral Biol Med*. 14(2):305-316. 2003.
8. Bodary, P. *et al.*; Recent advances in understanding endogenous fibrinolysis: implications for molecular-based treatment of vascular disorders. *Exp. Rev. Mol. Med*. 2002
9. Boer, J. *et al.*; Alpha-2-Macroglobulin Functions as an Inhibitor of Fibrinolytic, Clotting, and Neutrophilic Proteinases in Sepsis: Studies Using a Baboon Model. *Infection and Immunity*. Vol.61; p. 5035-5043. 1993
10. Bombeli, T.; Spahn D.; Updates in perioperative coagulation: physiology and management of thromboembolism and haemorrhage. *Br J Anaesth*. 93(2):275-87. 2004
11. Borth, W.; α 2-Macroglobulin, a multifunctional binding protein with targeting characteristics. *The FASEB Journal*. Vol.6. 1992
12. Brownlee, M.; The pathobiology of diabetic complications. A unifying mechanism. *Diabetes*; 54: 1615-25. 2005
13. Calles-Escandon, J.; Cipolla, M.; Diabetes and Endothelial Dysfunction: A Clinical Perspective. *Endocrine Reviews* 22(1): 36–52. 2001
14. Carda, C. *et al.*; Structural and functional salivary disorders in type 2 diabetic patients. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 11(4):309-314. 2006.

15. Carda, C. *et al.*; Structural differences between alcoholic and diabetic parotid sialosis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 10(4):309-314. 2005
16. Carrell, R. *et al.*; Alpha-1 Antitrypsin Deficiency-A Model for Conformational Diseases. *New England Journal of Medicine*. 346: 45-53. 2002
17. Chan, J. *et al.*; Accelerated Skin Wound Healing in Plasminogen Activator Inhibitor-1-Deficient Mice. *American Journal of Pathology*; Vol. 159, No. 5. 2001
18. Chen, J. *et al.*; Tissue factor as a link between wounding and tissue repair. *Diabetes*; 54: 2143-54. 2005.
19. Dunn, E. *et al.*; Molecular mechanisms involved in the resistance of fibrin to clot lysis by plasmin in subjects with type 2 Diabetes mellitus. *Diabetologia*; 49: 1071 – 1080. 2006
20. Emmerich, J.; α 1-antitrypsin and the maintenance of hemostatic balance. *Haematologica*; 94(6). 2009
21. Eubanks, J; Antifibrinolytics in Major Orthopaedic Surgery. *J Am Acad Orthop Surg*; Vol 18, No 3, 132-138. 2010
22. Fadini, G.; Agostini, C.; Avogaro, A.; Endothelial progenitor cells and vascular biology in Diabetes mellitus: current knowledge and future perspectives. *Curr Diabetes Rev*; 1: 41-58. 2005
23. Falanga, V.; Wound healing and its impairment in the diabetic foot. *Lancet* 366:1736 – 1743. 2005.
24. Golay, A.; Ybarra, J.; Link between obesity and type 2 Diabetes. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. Vol. 19, 4, pp. 649-663. 2005.
25. Goova, M. *et al.*; Blockade of receptor for advanced glycation end-products restores effective wound healing in diabetic mice. *Am J Pathol*; 159: 513-25. 2001
26. Grant, P.; Diabetes mellitus as a prothrombotic condition. *J Intern Med*; 262: 157-72. 2007
27. Hartge, M.; Unger, T.; Kintscher, U.; The endothelium and vascular inflammation in Diabetes. *Diabetes Vasc Dis Res*; 4:84-8. 2007
28. Hashemi, M. *et al.*; Impaired activity of serum alpha-1-antitrypsin in Diabetes mellitus. *Diabetes Research and Clinical Practice* 75; 246-248. 2007
29. Heywood, D. *et al.*; Factor VII gene polymorphisms, factor VII:C levels and features of insulin resistance in non-insulin-dependent Diabetes mellitus. *Thromb Haemost*; 75: 401-6. 1996
30. International Expert Committee; International Expert Committee report on the role of the A1C assay in the diagnosis of Diabetes. *Diabetes Care*;32:1327-1334. 2009.

31. Irving, J. *et al*; Phylogeny of the Serpin Superfamily: Implications of Patterns of Amino Acid Conservation for Structure and Function. *Genome Res.* 10: 1845-1864. 2000
32. Jansson, P.; Endothelial dysfunction in insulin resistance and type 2 Diabetes. *J Intern Med*; 262: 173-83. 2007
33. Kamgar, M. *et al*; Impaired fibrinolytic activity in type II diabetes: Correlation with urinary albumin excretion and progression of renal disease. *Kidney International*; 69, 1899–1903. 2006
34. Kasper, D.L. *et al.*; Harrison Medicina Interna. *McGraw-Hill Medical*, 16ª edição, Vol. II, Cap. XV, pp.2260-2288. 2005
35. Keswani, S. *et al.*; Adenoviral mediated gene transfer of PDGF-B enhances wound healing in type I and type II diabetic wounds. *Wound Repair Regen* 12:497 – 504. 2004.
36. Krarup, A. *et al*; Simultaneous Activation of Complement and Coagulation by MBL-Associated Serine Protease 2. *PLoS ONE.* 2(7): e623. doi:10.1371. 2007
37. Lamster, I. *et al.*; The Relationship Between Oral Health and Diabetes Mellitus. *J Am Dent Assoc.* Vol. 139, pp. 19S-24S. 2008.
38. Li, R-X; Chen, H-B; Tu, K.; Zhao, S-L; Zhou, H.; *et al.* Localized-Statistical Quantification of Human Serum Proteome Associated with Type 2 Diabetes. *PLoS ONE* 3(9): e3224. doi:10.1371/journal.pone.0003224. 2008.
39. Liu, T. *et al*; Human plasma N-glycoproteome analysis by immunoaffinity subtraction, hydrazide chemistry, and mass spectrometry. *J. Proteome Res.* 4:2070-2080. 2005
40. Lobmann, R. *et al.*; Differential effects of PDGF-BB on matrix metalloproteinases and cytokine release in fibroblasts of type 2 diabetic patients and normal controls in vitro. *J Diabetes Complicat*; 20: 105–12. 2006.
41. Loot, M. *et al.*; Fibroblasts derived from chronic diabetic ulcers differ in their response to stimulation with EGF, IGF-1, bFGF and PDGF-AB compared to controls. *Eur J Cell Biol*; 81: 153–60. 2002.
42. Mafirci, A.; Proietti, R.; Aterotrombosi e diabete mellito di tipo 2: analisi dei principali meccanismi fisiopatogenetici. *G Ital Cardiol*; 11 (6): 467-477. 2010
43. Mi, H. *et al.*; PANTHER version 7: improved phylogenetic trees, orthologs and collaboration with the Gene Ontology Consortium. *Nucleic Acids Res*, 38(Database issue), pp.D204-10. 2010
44. Missov, R. *et al*; Plasma fibrinogen in NIDDM: the Rotterdam study. *Diabetes Care*; 19: 157-9. 1996
45. Musalmah, M. *et al.*; Effect of vitamin E on plasma malondialdehyde, antioxidant enzyme levels and the rates of wound closures during wound healing in normal and diabetic rats. *Asia Pac J Clin Nutr* ; 11(Suppl. 7): S448–51. 2002.

46. Nassar, H. *et al.*; Diabetic Periodontitis: a model for activated innate immune and impaired resolution of inflammation. *Periodont 2000*. Vol. 43, pp. 233-244. 2007
47. Negrato C.; Tarzia O.; Buccal alterations in Diabetes mellitus. *Diabetology & Metabolic Syndrome*. 2:3. 2010.
48. Neville, B. *et al.*; Manifestações orais de doenças sistêmicas. Patologia oral e maxilofacial. 2a edição Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 601. 2004.
49. Niemann, M. *et al.*; Isolation and serine protease inhibitory activity of the 44-residue, C-terminal fragment of alpha 1-antitrypsin from human placenta. *Matrix*. (3):233-41. 1992
50. Nishimura, F. *et al.*; The Periodontal Host Response with Diabetes. *Periodontol 2000*. Vol. 43, pp. 245-253. 2007.
51. Novoseek. Novoseek, <http://www.novoseek.com/Welcome.action>. 2008
52. OralCard. OralCard, <http://bioinformatics.ua.pt/OralCard/> 2011
53. Pacheco, E. *et al.*; Effects of the Diabetes mellitus types 1 and 2 on the saliva secretion and composition in humans. *Braz J Oral Sci*. 4:854. 2005.
54. Peppas, M. *et al.*; Advanced glycoxidation products and impaired diabetic wound healing. *Wound Rep Reg*. 17 461–472. 2009
55. Peter, A. *et al.*; The acute inflammatory response and its regulation. *Arch Surg*; 134:666–9. 1999
56. Phadke, M. *et al.*; Non enzymatic glycosylation of alpha-1-proteinase inhibitor of human plasma. *J Postgrad Med*; 44:29-34. 1998
57. PubMed. PubMed, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. 2009
58. Pucher, J.; Stewart, J.; Periodontal Disease and Diabetes Mellitus. *Curr Diab Rep*. Vol. 4, 1, pp. 46-50. 2004.
59. PyMOL. The PyMOL Molecular graphics System, Version 1.2r3pre, Schrödinger, LLC. 2008
60. Rao, P. V.; Reddy, A. P.; Lu, X.; Dasari, S.; Krishnaprasad, A.; Biggs, E.; Roberts, C. T.; Nagalla, S. R. Proteomic Identification of Salivary Biomarkers of Type-2 Diabetes. *Journal of Proteome Research*. 8, 239–24. 2009
61. Rask-Madsen, C.; King, G.; Mechanisms of disease: endothelial dysfunction in insulin resistance and Diabetes. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*; 3: 46-56. 2007
62. Rosa, N.; Correia, M; Arrais, J.; Lopes, P.; Oliveira, J.; Barros, M.; From the salivary proteome to the OralOme. Em preparação.
63. Saito, T.; Shimazaki, Y.; Metabolic disorders related to obesity and periodontal disease. *Periodont 2000*. Vol. Vol. 43, pp. 254–266. 2007.

64. Schafer, A.; Bauersachs, J.; Endothelial dysfunction, impaired endogenous platelet inhibition and platelet activation in Diabetes and atherosclerosis. *Curr Vasc Pharmacol*; 6: 52-60. 2008
65. Schalkwijk, C.; Stehouwer, C.; Vascular complications in Diabetes mellitus: the role of endothelial dysfunction. *Clin Sci*; 109: 143-59. 2005
66. Singer A.; Clark, R.; Cutaneous wound healing. *N Engl J Med*; 341: 738–46. 1999.
67. Skamagas, M. *et al.*; Update on Diabetes mellitus: prevention, treatment, and association with oral diseases. *Oral Diseases*. 14, 105–114. 2008
68. Sobel, B.; Schneider, D.; Platelet function, coagulopathy, and impaired fibrinolysis in Diabetes. *Cardiol Clin*; 22: 511-26. 2004
69. Sottrup-Jensen, L. *et al.*; Primary structure of human alpha 2-macroglobulin. V. The complete structure. *J. Biol. Chem.* 259:8318-8327. 1984
70. Stasi, R. *et al.*; Effects of eradication of *Helicobacter pylori* infection in patients with immune thrombocytopenic purpura: a systematic review. *Blood*;113:1231-40. 2009
71. Stratmann, B.; Tschoepe, D.; Pathobiology and cell interactions of platelets in Diabetes. *Diab Vasc Dis Res*; 2: 16-23. 2005
72. Sundsten, T; Ortsäter, H.; Proteomics in diabetes research. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 297; 93–103. 2009
73. Szklarczyk, D. *et al.*; The STRING database in 2011: functional interaction networks of proteins, globally integrated and score. *Nucleic Acids Research*, Vol39. 2011
74. Taylor, G.; Borgnakke, W.; Periodontal Disease: associations with Diabetes, glycemic control and complications. *Oral Dis*. 14:191-203. 2008.
75. Tekeli, A. *et al.*; *Candida* carriage and *Candida dubliniensis* in oropharyngeal samples of type-1 Diabetes mellitus patients. *Mycoses*, 47(7):315-318. 2004.
76. The UniProt Consortium; Ongoing and future developments at the Universal Protein Resource. *Nucleic Acids Res*. 39: D214-D219. 2011.
77. Thomas, P.D. *et al.*; PANTHER: a library of protein families and subfamilies indexed by function. *Genome Res*, 13(Supplementary Materials), pp.2129-41. 2003
78. Thomson, S. *et al.*; A novel primate model of delayed wound healing in Diabetes: dysregulation of connective tissue growth factor. *Diabetologia*. 53:572 – 583. 2010.
79. Tófoli, G. *et al.*; Tratamento odontológico em pacientes com Diabetes mellitus. *Rev Assoc Paul Cir Dent*, 59:306-310. 2005
80. Tomasek, J. *et al.*; Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol*;3: 349–63. 2002

- 81.** Toth, C. *et al.*; Receptor for advanced glycation end products (RAGE) and experimental diabetic neuropathy. *Diabetes*; 57: 1002–17. 2008
- 82.** Trengove, N. *et al.*; Analysis of the acute and chronic wound environments: the role of proteases and their inhibitors. *Wound Repair Regen*; 7: 442–52. 1999.
- 83.** Tsuda, I. *et al.*; Structure–Inhibitory Activity Relationship of Plasmin and Plasma Kallikrein Inhibitors. *Chem. Pharm. Bull.* 49(11) 1457—1463. 2001
- 84.** Van Der Graaf, F. *et al.*; Inactivation of Kallikrein in Human Plasma. *J. Clin. Invest.* Volume 71; 149-158. 1983
- 85.** Vasquez, M.; Contreras, S.; Candida hyphas presence in adults with clinically healthy oral mucous. *Rev Estomatol Herediana*, 15:1. 2005
- 86.** Vernillo, T.; Dental considerations for the treatment of patients with Diabetes mellitus. *J Am Dent Assoc.* 134:24S-33S. 2003.
- 87.** Wetzler, C. *et al.*; Large and sustained induction of chemokines during impaired wound healing in the genetically diabetic mouse: prolonged persistence of neutrophils and macrophAGE during the late phase of repair. *J Invest Dermatol* ; 115: 245–53. 2000
- 88.** Winocour, P. *et al.*; Decreased platelet membrane fluidity due to glycation or acetylation of membrane proteins. *Thromb Haemost* ; 68: 577-82. 1992

7. Anexos

7.1 Índice de figuras

Figura 1	Diagrama resumido dos processos de coagulação e fibrinólise.....	9
Figura 2	Efeitos dos níveis aumentados de PAI-1 na DMT2.....	11
Figura 3	Estrutura molecular nativa da SERPINA1.....	14
Figura 4	Fluxograma com a metodologia seguida para o tratamento da informação ...	33
Figura 5	Fontes de produção salivar das proteínas do OralCard.....	37
Figura 6	Fontes de produção salivar das proteínas alteradas na DMT2	37
Figura 7	Vias de sinalização: proteínas da saliva na DMT2, da saliva normal normal e do Genoma humano	38
Figura 8	Funções moleculares das proteínas salivares alteradas na DMT2	40
Figura 9	Proteínas salivares alteradas na DMT2 envolvidas nas funções de ligação e de actividade catalítica	40
Figura 10	Gráfico representativo da via da coagulação sanguínea	42
Figura 11	Rede de interacções moleculares entre A2M e SERPINA1	43
Figura 12	Alterações da cascata da coagulação sanguínea na DMT2.....	44
Figura 13	Estrutura tridimensional da SERPINA1 com representação do locais de glicosilação não enzimática.....	47
Figura 14	Acção da KLKB1 na coagulação	48
Figura 15	Estado de hipofibrinólise na DMT2.....	50

7.2 Índice de tabelas

Tabela 1	Proteínas salivares alteradas na DMT2.....	36
Tabela 2	Proteínas e células alteradas na DMT2	45

7.3 Índice de abreviaturas

A2M alfa-2-macroglobulina

ADA The American Diabetes Association

AGE produtos finais de glicosilação avançada

CTGF factor de crescimento de tecido conjuntivo

DM Diabetes mellitus

DMT2 Diabetes mellitus tipo 2

ECM matriz extracelular

eNOS sintase endotelial do óxido nítrico

F2 trombina

FADH2 flavina adenina dinucleotídeo

HbA1c hemoglobina A1c

IgA imunoglobulina A

IL-1 interleucina-1

IL-1 β interleucina-1 beta

IL-6 interleucina 6

IL-8 interleucina 8

KLKB1 calicreína plasmática

MAPK proteína cinase activada por mitogénio

MMPs metaloproteinases da matriz

NADH nicotinamida adenina dinucleotídeo

NF- κ B factor nuclear kappa B

NO óxido nítrico

PAI-1 inibidor do activador de plasminogénio do tipo 1

PARP poli ADP-ribose polimerase

PDGF factor de crescimento derivado de plaquetas

PKC proteína cinase C

RAGE receptores de produtos finais de glicosilação avançada

SERPINA1 alfa-1-antitripsina

SERPINC1 antitrombina

TGF- β factor transformador de crescimento

TNF- α factor de necrose tumoral alfa

tPA ativador tecidual do plasminogénio

VASP fosfoproteína estimulada por vasodilatação

VCAM-1 molécula de adesão celular vascular 1

VEGF factor de crescimento do endotélio vascular

vWF factor de von Willebrand

