



UNIVERSIDADE CATÓLICA PORTUGUESA | INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

O ORALOMA DA DIABETES MELITOS TIPO 1 VS DIABETES
MELITOS TIPO 2 - UM ESTUDO COMPARATIVO

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

Por

Vítor Daniel Moreira Brás

Viseu - 2013



UNIVERSIDADE CATÓLICA PORTUGUESA | INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

O ORALOMA DA DIABETES MELITOS TIPO 1 VS.
DIABETES MELITOS TIPO 2 - UM ESTUDO COMPARATIVO

Por

Vítor Daniel Moreira Brás

Sob a orientação do Professor Doutor Nuno Rosa

Viseu - 2013

-The empires of the future are the empires of the mind-
Sir Winston Churchill

Agradecimentos

Ao Professor Doutor Nuno Rosa
Pelo apoio, motivação, orientação e disponibilidade. Por ter guiado o meu pensamento e trabalho na direcção certa.

À Professora Doutora Maria José
Pela frontalidade e por toda a ajuda, não apenas na tese mas ao longo do curso.

À Professora Doutora Marlene Barros
Pela arte de guiar trabalhos e pensamentos apenas pondo as questões certas.

Ao meu pai,
Que me deu as bases do que sou hoje e que mesmo sem aqui estar está sempre.

À minha mãe,
Por ser o meu pilar, pela dedicação, pelo amor incondicional. A minha ídola, que me inspira e motiva.

Ao Diogo,
Parceiro de infância e adolescência, pelo afecto, companheirismo e pelas lições que me dá.

À Mariana,
Pelo amor e dedicação, que com apenas um sorriso ilumina a minha vida.

Aos avós, Irene, Artur e Maria
meus heróis e anjos da guarda,

Ao Tio Rui e Tia Milu
pelo amor, por serem exemplos de vida para mim, por tudo.

Ao Tio Vítor, Tia Elizabeth, Francisco
Pelo afecto, amizade e amor.

À Madalena, António, Rodrigo e a restante "família de Tondela"
Que tão bem me acolheram e apoiaram, pela amizade e companheirismo que em mim depositaram

Ao Nuno,
Por tudo.

À Patrícia Moreira
Pela cooperação e amizade

Índice

1	Introdução	1
1.1	Diabetes Melitos	1
1.2	Epidemiologia da Diabetes Melitos	1
1.2.1	Patogénese da Diabetes Melitos tipo 1	2
1.2.2	Patogénese da Diabetes Melitos tipo 2	3
1.2.3	Patogénese das complicações da Diabetes Melitos	3
1.2.4	Sintomatologia da Diabetes Melitos	5
1.2.5	Tratamento da Diabetes Melitos	5
1.3	Interesse e desafios da utilização da saliva como fluido de diagnóstico	6
1.4	O oraloma da Diabetes Melitos tipo 1 e 2	7
1.4.1	O Oraloma da Diabetes Melitos tipo 1 e 2 - estado da arte	7
1.5	Ferramentas bioinformáticas para o estudo do oraloma	8
2	Objectivos	9
3	Material e Métodos	11
3.1	Atualização do Oraloma da DMT1 e DMT2	11
3.2	Caracterização do Oraloma da DMT1 e DMT2	12
3.2.1	Anotação dos dados obtidos na revisão da literatura	13
3.2.2	Caracterização segundo ontologias	16
3.2.3	Interpretação da Interactómica das proteínas alteradas	19
3.2.4	Comparação entre os Oralomas da Diabetes Melitos tipo 1 e 2 e o total de anotações do Oralome	22
3.2.5	Comparação da microflora oral da Diabetes Melitos tipo 1 e 2	23
4	Resultados e Discussão	25
4.1	Revisão de literatura e anotação manual dos dados obtidos	25
4.1.1	OralOma da Diabetes Melitos tipo 1	26
4.1.2	OralOma da Diabetes Melitos tipo 2	27
4.1.3	Metodologia dos estudos seleccionados na revisão da literatura	28
4.2	Caracterização do Oraloma do paciente diabético	30
4.2.1	Caracterização segundo Ontologias génicas	30
4.2.2	Comparação do oraloma do paciente diabético com o total de anotações do Oralome	41
4.2.3	<i>Caracterização da Interatómica das proteínas alteradas no oraloma de pacientes diabéticos</i>	47
4.2.4	Comparação da microflora oral da Diabetes Melitos tipo 1 e 2	52
5	Conclusão	55
6	Bibliografia	57
7	Anexos	65
7.1	Anexo 1 - Tabela do oraloma da DMT1	65
7.2	Anexo 2 - Tabela do oraloma da DMT2	69
7.3	Anexo 3 - Comparação DMT1-DMT2	93
7.4	Anexo 4 - DMT1 comparado ao OralOma normal	94
7.5	Anexo 5 - DMT2 comparada ao oraloma normal	96

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1 - - CAMPOS DE INFORMAÇÃO ANOTADA MANUALMENTE PARA CADA UMA DAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS. 1-IDENTIFICAÇÃO DA PROTEÍNA; 2- PROVENIÊNCIA DA PROTEÍNA; 3-PROTEÍNA PRESENTE EM IND. SAUDÁVEIS; 4- IDENTIFICAÇÃO DA DOENÇA; 5-REGULAÇÃO; 6- CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO ESTUDADA; 7- METODOLOGIA DO ESTUDO; 8- PROTEÍNA COM MODIFICAÇÕES PÓS-TRANSCRIPCIONAIS; 9-PROTEÍNA IDENTIFICADA COMO BIOMARCADOR DA PATOLOGIA; 10 - CÓDIGO NCBI DO ARTIGO, 11- OBSERVAÇÕES, INFORMAÇÕES ADICIONAIS.	14
FIGURA 3 - METODOLOGIA PARA CRIAR GRÁFICOS CIRCULARES. MF- MOLECULAR FUNTION, BP - BIOLOGICAL PROCESS, CC - CELULAR COMPONENT, PC - PROTEIN CLASS, UTILIZANDO A FERRAMENTA PANTHER.	18
FIGURA 5 - PÁGINA DE ROSTO DA FERRAMENTA BIOINFORMÁTICA STRING, PARA ESTUDOS DE INTERATÓMICA	20
FIGURA 6 - PÁGINA DE "INPUT" DA FERRAMENTA BIOINFORMÁTICA STRING MOSTRANDO A INTRODUÇÃO DAS PROTEÍNAS ALTERADAS EM DIABETES MELITOS TIPO 2.	20
FIGURA 8 - PROVENIÊNCIA HISTOLÓGICA DAS PROTEÍNAS ALTERADAS EM CASOS DE DIABETES MELITOS TIPO 1	27
FIGURA 9 - PROVENIÊNCIA DAS PROTEÍNAS ALTERADAS EM CASOS DE DIABETES MELITOS TIPO 2	27
FIGURA 10 - DIFERENÇA FRACCIONAL DO ORALOMA DA DMT1 EM RELAÇÃO AO ORALOMA DA DMT2, ESTÃO APENAS REPRESENTADAS AS FUNÇÕES MOLECULARES COMUNS ENTRE OS DOIS ORALOMAS (* VALORES COM <i>P-VALUE</i> <0,05)	31
FIGURA 12 - DIFERENÇA FRACCIONAL DO ORALOMA DA DMT1 EM RELAÇÃO AO ORALOMA DA DMT2, ESTÃO APENAS REPRESENTADAS OS PROCESSOS BIOLÓGICOS COMUNS ENTRE OS DOIS ORALOMAS (* VALORES COM <i>P-VALUE</i> <0,05)	34
FIGURA 13 - DIFERENÇA FRACCIONAL ENTRE OS ORALOMAS DOS DOIS TIPOS DE DIABETES MELITOS QUANTO À ONTOLOGIA DE VIAS DE SINALIZAÇÃO (* VALORES COM <i>P-VALUE</i> <0,05)	37
FIGURA 16 - DIFERENÇA FRACCIONAL ENTRE OS ORALOMAS DOS DOIS TIPOS DE DIABETES MELITOS E O DE INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS, QUANTO À ONTOLOGIA DE FUNÇÕES MOLECULARES (* VALORES COM <i>P-VALUE</i> <0,05)	43

FIGURA 17 - DIFERENÇA FRACCIONAL ENTRE OS ORALOMAS DOS DOIS TIPOS DE DIABETES MELITOS E O DE INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS, QUANTO À ONTOLOGIA DE VIAS DE SINALIZAÇÃO (TODOS OS VALORES APRESENTADOS POSSUEM P -VALUE<0,05)

45

Índice de tabelas

TABELA 1 - PROTEÍNAS QUE OS ORALOMAS DOS DOIS TIPOS DE DIABETES MELITOS TÊM EM COMUM 26

TABELA 2 - MICRORGANISMOS COMUNS ANOTADOS QUE FORAM QUANTIFICADOS NA CAVIDADE ORAL DE PACIENTES COM AMBOS OS TIPOS DE DIABETES. (*CONSTANT SITE - FACE MESIO-VESTIBULAR DO PRIMEIRO MOLAR SUPERIOR DIREITO; DEEPEST SITE - LOCAL MAIS PROFUNDO À SONDAGEM) 53

Lista de abreviaturas

DMT - Diabetes Melitos

EGF - Epidermal growth factor

GLUT - Glucose transporter type

IFN - Interferon

IL - Interleukin

IRS - Insulin receptor substrate

TNF - Tumour necrosis factor

Resumo

A Diabetes Melitos é uma doença de grande prevalência a nível mundial e os seus mecanismos fisiopatológicos não são ainda totalmente conhecidos.

Actualmente, a terapêutica seguida em casos de Diabetes Melitos é eminentemente sintomática consistindo na administração de insulina nos casos de Diabetes Melitos tipo 1 ou quando se verifica a falência das células beta do pâncreas de pacientes com Diabetes Melitos tipo 2, ou no controlo da glicemia nos casos de Diabetes Melitos tipo 2.

A hiperglicemia, fenótipo característico desta patologia, produz efeitos negativos no organismo a longo prazo, levando à modificação estrutural e funcional de várias proteínas, afectando, deste modo, diversos processos moleculares em que intervêm estas proteínas.

Os dois tipos Diabetes Melitos influenciam, de forma diferenciada, a expressão de diversas proteínas, produzindo efeitos ao nível das vias de sinalização celular e nos processos biológicos celulares.

Consequentemente, conhecer as características moleculares dos dois tipos de Diabetes Melitos permite o desenvolvimento de técnicas diagnósticas e terapêuticas mais precoces e eficazes específicas para cada uma delas.

Tendo como base o proteoma da cavidade oral, denominado Oraloma, este estudo pretende actualizar os dados provenientes de estudos de proteómica da cavidade oral de pacientes com os dois tipos de Diabetes Melitos e estudá-los com recurso a ferramentas bioinformáticas que permitem a caracterização das proteínas indexadas.

Dado a cavidade oral ser um ecossistema, é indissociável dos microrganismos que nele existem. Consequentemente, é objectivo deste estudo anotar as estirpes de microrganismos identificados pela literatura actual, por forma a caracterizar de forma mais completa este aspecto molecular da cavidade oral.

Palavras-chave: diabetes, oraloma, proteómica, bioinformática

Abstract

Diabetes Mellitus is a disease with high prevalence worldwide with pathophysiological mechanisms not yet fully understood.

Nowadays, the therapeutical approach of Diabetes Mellitus is mainly a symptomatic one based on insulin administration to type 1 Diabetes Mellitus patients and type 2 Diabetes Mellitus patients with no functional pancreatic beta-cells or the serum glucose concentration control in type 2 Diabetes Mellitus patients.

Hyperglykemia is a characteristic phenotype of this pathology, it brings long-run negative effects on the organism due to its role on modifying proteins structure and function affecting the organism's integrity.

Both Diabetes Mellitus types influence, on different ways, protein expression hence leading to changes on the molecular signaling pathways and biologic process of the cells.

Thereafter, to know the molecular aspects of both Diabetes Mellitus types is key to develop better, more efficient and precocious diagnostic and therapeutic techniques.

Based on the oral proteome, namely the oralome, this study aims to update data from the pre-existing oral proteomic studies on both types of Diabetes Mellitus and to study them using bioinformatic tools which allow these proteins characterization.

Being an ecosystem, the oral cavity is inseparable of the microorganisms which inhabit in it. Therefore, another aim of the present study is to annotate the microorganisms species identified by the current scientific literature, in order to characterize in a more complete way this molecular aspect of the oral cavity.

Keywords: Diabetes, oralome, proteomics, bioinformatics

1 Introdução

1.1 Diabetes Melitos

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, a Diabetes Melitos é uma patologia crónica que ocorre quando o pâncreas não produz insulina suficiente para suprir as necessidades do organismo ou quando, apesar de o pâncreas produzir insulina, o organismo não consegue utilizar eficazmente a insulina produzida. Como corolário desta definição, é correto afirmar que a Diabetes Melitos é um grupo de distúrbios metabólicos que compartilham o fenótipo de hiperglicemia.

A principal causa de morte em pacientes diabéticos são complicações das artérias coronárias, geralmente o enfarte do miocárdio¹.

1.2 Epidemiologia da Diabetes Melitos

A prevalência desta patologia atingiu proporções epidémicas, traduzindo-se, segundo estimativa da Organização Mundial de Saúde em 2008, em cerca de 200 milhões de indivíduos afetados. Se se mantiverem os padrões atuais, estima-se que até 2050 hajam 500 000 000 de indivíduos diabéticos.

Existem dois tipos mais prevalentes de Diabetes Melitos, o tipo 1 e o tipo 2.

A Diabetes Melitos tipo 2 é a mais prevalente, consistindo em cerca de 85 a 90% de todos os casos de Diabetes Melitos; sendo que a Diabetes Melitos tipo 1, uma doença autoimune em que são produzidos anticorpos para a enzima GAD (*glutamic acid decarboxylase*) acabando por atacar e destruir as células β pancreáticas produtoras de insulina, é menos comum.

Apesar de haver uma componente genética na incidência de Diabetes Melitos tanto de tipo 1 como de tipo 2, a Diabetes Melitos tipo 2 é influenciada, em cerca de 10% de indivíduos diabéticos deste tipo, por fatores individuais de risco tais como a obesidade e o estilo de vida sedentário.

A prevalência de Diabetes Melitos a nível mundial é crescente, mais marcada em países em desenvolvimento^{2,3}.

1.2.1 Patogénese da Diabetes Melitos tipo 1

Uma redução no número de células β provoca um défice quase absoluto de insulina. Este tipo de Diabetes Melitos desenvolve-se normalmente na infância, tornando-se mais severo na puberdade⁴.

A Diabetes Melitos tipo 1 causa grandes distúrbios metabólicos e fisiológicos. O défice de insulina não permite a entrada de glucose do sangue para a célula, isto provoca um estado de inanição metabólica.^{4,5} Consequentemente a baixa concentração de insulina sanguínea aliada a uma alta concentração de glucagão e epinefrina culminam na lipólise de triglicérideos do tecido adiposo⁵. Os ácidos gordos libertados são transportados na corrente sanguínea pela albumina e sofrem β -oxidação a nível intracelular. Os resultados desta reacção são a acetil-coenzima A e enzimas reduzidas (NADH e FADH₂), utilizadas no ciclo TCA e na fosforilação oxidativa nos tecidos. A quantidade de acetil-coenzima A produzida a partir de ácidos gordos é superior à que pode ser metabolizada, o excedente não-metabolizado é transformado em corpos cetónicos (acetoacetato, hidroxibutirato e acetona). A continuada formação de corpos cetónicos produz um estado de cetoacidose (acidose metabólica), que por sua vez provoca alteração no balanço electrolítico do organismo (diurese osmótica) levando o indivíduo a excretar volumes significativos de urina, devido à presença de glucose no fluido glomerular renal. Esta patologia pode ser fatal se não tratada, consistindo o tratamento na administração de insulina^{4,5}.

Existe também uma susceptibilidade genética na Diabetes Melitos tipo1, cerca de 95% dos pacientes brancos com Diabetes tipo 1 possuem tanto o alelo HLA-DR3 ou HLA-DR4 ou mesmo ambos⁴. É sugerido que alterações na molécula HLA classe II pode produzir efeitos ao nível do reconhecimento nos receptores de células T e modificar também a apresentação de antigénios.

Ainda que não estejam definidos quais, existe sugestão da possibilidade de certos factores ambientais despoletarem os fenómenos de autoimunidade da Diabetes tipo 1, tais como vírus, retrovirus e toxinas⁴.

1.2.2 Patogénese da Diabetes Melitos tipo 2

Na patogénese da Diabetes Melitos tipo 2, não existe evidência de fenómenos autoimunes como na Diabetes Melitos tipo 1, embora o estilo de vida e a predisposição genética sejam mais preponderantes no desenvolvimento da doença.

Na Diabetes Melitos tipo 2 existem dois defeitos metabólicos característicos: diminuição da secreção de insulina pelas células β e na resistência dos tecidos à insulina.

No início da sua patogénese, não se verifica qualquer diminuição na secreção de insulina, contudo o padrão pulsátil e oscilatório da sua secreção é perdido. Isto demonstra alterações ao nível da resposta das células β à hiperglicemia, ainda não ocorrendo modificações na síntese de insulina.

A contínua exposição a elevados níveis de glucose e de ácidos gordos livres leva a uma hipersensibilização das células β do pâncreas culminando na sua apoptose por consequência do stress causado pelos ácidos gordos livres ao nível do retículo endoplasmático (processo que depende de NF- κ B e Óxido nítrico)⁶.

A resistência à insulina resulta de dois fatores, diminuição do número de receptores de insulina na membrana celular e a cascata de sinalização intracelular após ligação da insulina no receptor estar comprometida⁴.

1.2.3 Patogénese das complicações da Diabetes Melitos

Ambos os tipos de Diabetes Melitos possuem as mesmas morbilidades, nomeadamente microangiopatia, retinopatia, nefropatia e neuropatia. À luz da literatura actual, estas complicações advêm da hiperglicemia. Quando a hiperglicemia está controlada, estas complicações são menos frequentes.

Duas razões principais estão na génese destas complicações em pacientes diabéticos, a glicosilação não-enzimática e a hiperglicemia intracelular e os seus efeitos na via de sinalização dos polióis.

No que concerne a glicosilação não enzimática, esta define-se como a ligação química reversível que ocorre entre a glucose e o grupo amina de

uma proteína sem o auxílio de enzimas. Os produtos de reacção da glicosilação não-enzimática envolvem proteínas como o glicogénio e outras da matriz extracelular que posteriormente sofrerão modificações estruturais tornando a ligação proteína-glicose irreversível. Quando a glicosilação da proteína se torna irreversível origina os denominados produtos avançados de glicosilação ou AGE's (*advanced glycosilation end-products*) que dado as suas características bioquímicas (a adição de açúcar à sua estrutura altera-a e com isso a sua função) são potencialmente patogénicos⁷.

Os AGE's ocorrem não apenas com proteínas mas também com lípidos e ácidos nucleicos⁷. Quando ocorrem com proteínas como o glicogénio, formam ligações cruzadas entre os polipéptidos da molécula de glicogénio e no processo aprisionam proteínas plasmáticas ou intersticiais⁷. Quando tal ocorre em grandes vasos sanguíneos, por exemplo, aprisionam lipoproteínas de baixa densidade que leva à deposição de colesterol promovendo a aterogénese⁷. Em capilares como os glomerulares renais, a albumina liga-se à membrana basal glicosilada provocando o seu espessamento, característico em microangiopatia diabética⁷. Como os AGE's resistem à digestão proteolítica, dificultam a remoção de proteínas e as ligações cruzadas que formam aumentam a deposição de proteínas⁷. De facto, a ligação cruzada provocada pelos AGE's entre as proteínas da matriz extracelular impede a interacção destas proteínas com outros componentes da matriz extracelular provocando defeitos funcionais e estruturais⁷.

Os AGE's possuem a capacidade de se ligar aos receptores de vários tipos de células tais como:

- células endoteliais,
- monócitos
- linfócitos,
- macrófagos
- células mesangiais.

Esta ligação provoca efeitos biológicos dependendo do tipo de célula. Nos monócitos promove a sua migração, nos macrófagos a secreção de factores de crescimento e citocinas. Também aumentam a permeabilidade das células endoteliais, aumentam a actividade procoagulante de macrófagos

e células endoteliais e provocam o aumento de produção de matriz extracelular por parte dos fibroblastos e do músculo liso.

A hiperglicemia intracelular ocorre em tecidos que não necessitam de insulina para captar glicose do meio extracelular, como tecidos nervosos, tecidos da córnea, capilares, rins. Em situações de hiperglicemia, grandes quantidades de glicose entram para o meio intracelular e são modificados enzimaticamente formando sorbitol e posteriormente frutose. Os elevados níveis de sorbitol e frutose intracelular promovem um influxo aumentado de água levando à turgescência celular provocando lesões celulares osmóticas. Em tecidos como os da córnea, esta turgescência provoca opacidade e um aumento de volume. Os níveis intracelulares elevados de sorbitol comprometem a função das bombas de iões lesando as células de *Schwann* e os perícitos dos capilares da retina, resultando em neuropatia periférica e em microaneurismas da retina. O tratamento com inibidores da enzima que modifica a glicose em sorbitol, a aldose redutase, parece inibir o desenvolvimento de neuropatias e cataratas⁴.

1.2.4 Sintomatologia da Diabetes Melitos

A sintomatologia da Diabetes Melitos é semelhante para os dois tipos, contudo no caso da Diabetes Melitos tipo 1 os sintomas podem surgir subitamente ao passo que na Diabetes Melitos tipo 2 podem aparecer mais tardiamente sendo o diagnóstico efectuado anos após o *onset*. Os sintomas desta patologia podem compreender alterações na visão, poliúria, polidipsia, fome, perda de peso e fadiga¹.

1.2.5 Tratamento da Diabetes Melitos

A administração de insulina é o tratamento preferencial em casos de Diabetes Melitos tipo 1. Está clinicamente comprovado que o controlo dos níveis séricos de glicose em pacientes com Diabetes Melitos tipo 1 reduz a incidência das principais complicações desta patologia, tais como a retinopatia, nefropatia e a neuropatia⁸.

No que concerne o tratamento da Diabetes Melitos tipo 2 esta consiste fundamentalmente no controlo da dieta e no exercício físico, não sendo tão

complexa como nos casos de Diabetes Melitos tipo 1⁸. Neste tipo de Diabetes Melitos são utilizados hipoglicemiantes orais para controlar os níveis séricos de glicose, combatendo a resistência à insulina por parte das células do organismo do paciente diabético; são também administradas estatinas de modo a prevenir complicações ateromatosas⁸. A diminuição da pressão sanguínea demonstra melhorar a eficácia do tratamento da Diabetes Melitos tipo 2⁸.

Nenhum dos tratamentos atualmente em vigor vai além do controlo glicémico por parte do paciente, não tendo em conta as redes de interação moleculares que conduzem às complicações a longo prazo, responsáveis pela maior morbidade destas patologias. Urge, pois, esclarecer os mecanismos moleculares de desenvolvimento destas complicações.

1.3 Interesse e desafios da utilização da saliva como fluido de diagnóstico

A saliva tem-se destacado como um potencial fluido de diagnóstico nos últimos anos dado apresentar certas vantagens relativamente a outros testes e exames de diagnóstico. O diagnóstico utilizando saliva não é invasivo, requer pouca ou nenhuma qualificação (podendo a sua colecção ser feita pelo próprio paciente), a saliva possui marcadores presentes igualmente no sangue, pode vir a ser uma alternativa em pacientes pouco colaborantes ou em que a colheita de sangue seja mais complicada, pode ser utilizada para determinar concentrações farmacológicas em pacientes e a presença de substâncias ilícitas no organismo de um indivíduo^{9,10}.

Contudo, apesar das vantagens enumeradas, certas moléculas difundem-se mais facilmente na saliva que outras dado as suas características fisico-químicas; moléculas lipofílicas difundem-se mais rapidamente que moléculas lipofóbicas⁹. Outro obstáculo que a utilização da saliva enfrenta reside no facto de o seu fluxo ser variável de indivíduo para indivíduo e no mesmo indivíduo devido a múltiplos factores. Pacientes com doenças sistémicas, sujeitos a radioterapia e/ou polimedicados apresentam diferentes taxas de secreção por comprometimento das glândulas salivares⁹.

No que concerne a variabilidade salivar, estudos recentes de proteómica salivar demonstram que a variabilidade salivar se deve mais às diferenças inter-individuais que às diferenças intra-individuais¹¹. Outro factor que pode ter influência é o momento de colheita (altura do dia), existem estudos que defendem que a quantidade relativa de proteínas se mantém constante durante o dia¹¹ e outros estudos que afirmam que a concentração relativa de proteínas na saliva varia de forma constante e padronizada ao longo do dia¹².

1.4 O oraloma da Diabetes Melitos tipo 1 e 2

O oraloma, enquanto fisioma da cavidade oral, é o conjunto de proteínas presentes nesta cavidade e das suas características moleculares.^{13,14}

Estabelecer o oraloma de uma determinada patologia passa por esclarecer os mecanismos moleculares alterados como consequência dessa situação.. Para descrever o oraloma é necessário recorrer às ciências ómicas, proteómica, transcriptómica, metabolómica, genómica, interatómica, entre outros.

Actualmente são ainda escassos os estudos de proteómica aplicada à caracterização do oraloma da Diabetes Melitos tipo 1, havendo mais estudos nesta área a descrever o oraloma da Diabetes Melitos tipo 2.

1.4.1 O Oraloma da Diabetes Melitos tipo 1 e 2 - estado da arte

Até à data do início do presente estudo, estavam indexadas 15 proteínas¹⁵ no oraloma da Diabetes Melitos tipo 1 e 445 proteínas referentes ao oraloma da Diabetes Melitos tipo 2^{16,17}.

As 15 proteínas quantificadas no oraloma da Diabetes Melitos tipo 1 envolvem maioritariamente processos biológicos imunológicos, envolvendo as vias de sinalização de citocinas.

Ao contrário do que se verifica na Diabetes Melitos tipo 1 onde ainda são relativamente poucos os estudos de proteómica efectuados, existem 445 proteínas indexadas como alteradas no oraloma da diabetes Melitos tipo 2.

Deste universo de proteínas, os processos biológicos mais afectados são os processos metabólicos da glicose (havendo uma notória sobre-regulação das proteínas agonistas da gluconeogénese) e os processos biológicos de resposta a estímulos dos quais resulta uma sinalização intra-celular alterada, corroborando o facto de as vias de sinalização em que a insulina intervém estarem comprometidas.

1.5 Ferramentas bioinformáticas para o estudo do oraloma

Os dados gerados pelos vários estudos de proteómica que descrevem o oraloma de pacientes diabéticos necessitam, à semelhança de outros estudos aplicados a outras patologias, de ser integrados e sistematizados de modo a poderem ser modelados e interpretados, possibilitando outras inferências. O que se verifica é que existe uma grande quantidade de resultados dispersos na literatura carecendo de integração e interpretação como um todo e não em separado.

Nesse sentido, existe o OralCard¹⁸, uma ferramenta bioinformática que consiste num repositório que indexa os dados de diversos estudos de proteómica da cavidade oral a partir de anotações manuais.

Os dados obtidos através da revisão da literatura podem, posteriormente, ser interpretados com recurso a outras ferramentas bioinformáticas como o PANTHER¹⁹ e o STRING²⁰

2 Objectivos

O presente trabalho pretende, após revisão da literatura, reunir e integrar numa só plataforma os resultados dos diversos estudos de proteómica da cavidade oral referentes ao oraloma do paciente diabético, contribuindo através do estudo e análise *in silico* de tal informação para um melhor conhecimento dos mecanismos patogénicos dos dois tipos de Diabetes Melitos. Deste modo, foram objectivos deste trabalho:

- rever a literatura actual de estudos de proteómica da cavidade oral do paciente diabético;
- anotar manualmente a informação proveniente da revisão de artigos científicos, considerada essencial para interpretar os dados de proteómica;
- atualizar o OralCard com a informação anotada;
- analisar *in silico* os dados obtidos através de ferramentas bioinformáticas;
- registar e analisar as diferenças entre os dois tipos de Diabetes Melitos verificadas nas diversas ontologias génicas;
- correlacionar os dados obtidos e estudados com os aspectos clínicos da patogénese e patofisiologia da Diabetes Melitos
- anotar todos os microrganismos identificados pela literatura científica presentes na cavidade oral de pacientes com os dois tipos de Diabetes Melitos

3 Material e Métodos

Por forma a alcançar os objectivos propostos foi seguida a metodologia explicada neste capítulo.

Iniciou-se pela revisão da literatura e recolha de dados específicos quanto a proteínas alteradas nos casos de Diabetes Melitos tipo 1 e 2.

Numa segunda fase, a informação obtida foi analisada e interpretada com recurso a ferramentas bioinformáticas.

3.1 Atualização do Oraloma da DMT1 e DMT2

O Oraloma, que se encontra reunido no OralCard, espelha a fisiologia molecular da cavidade oral e tem por base a integração de informação proveniente das ciências ómicas tais como a genómica, transcriptómica, proteómica, interactómica e metabolómica.

Apesar do Oraloma já integrar informação referente aos dois tipos de Diabetes Melitos, tal carece de revisão e atualização constante uma vez que desde a última revisão surgiram mais estudos de proteómica salivar em pacientes diabéticos.

Sabendo que proteínas se encontram alteradas em cada tipo de Diabetes Melitos é possível comparar que vias de sinalização podem estar alteradas e que influência podem estas ter no ecossistema oral. Assim, foi efectuada uma revisão da literatura existente, de modo a atualizar o Oraloma de acordo com os mais recentes estudos de proteómica da cavidade oral.

Desde a última revisão do Oraloma¹³, mais estudos de proteómica da cavidade oral foram efectuados.

De modo a atualizar o Oraloma, recorreu-se ao arquivo digital de artigos científicos PubMed²¹ com a seguinte fórmula de pesquisa:

```
((("DMT1" OR "DMT 1" OR "diabetes Melitos Type 1") AND (saliva* OR oral) AND (protein OR proteomics) NOT treatment AND ("last 10 years"[PDat]))) AND ("last 10 years"[PDat]) cingida a estudos respeitantes a seres humanos e efectuados nos últimos 10 anos, para pesquisar literatura referente à Diabetes Melitus tipo 1. Foram considerados resultados até Janeiro de 2013,
```

inclusive.

Foram obtidos 119 resultados dos quais foram selecionados 14 artigos científicos^{15,22-34} contendo informações relevantes quanto às proteínas encontradas alteradas em pacientes com Diabetes Melitos tipo 1.

A mesma metodologia foi utilizada para pesquisar informação molecular oral sobre pacientes com Diabetes Melitos tipo 2. Foi utilizada a seguinte fórmula de pesquisa:

(DMT2) OR (DMT 2) OR (diabetes Melitos type 2) OR (type 2 diabetes Melitos) OR (non insulin dependent diabetes Melitos) AND (SALIV* OR oral) AND (proteome OR peptide OR protein OR proteomic) restringida a estudos efectuados entre 1/1/1997 e 31/01/2013 (dia em que foi efectuada a pesquisa) em seres humanos.

Foram obtidos 4323 resultados, dos quais foram selecionados 19 artigos científicos^{2,16,17,23,35-49}.

Os artigos selecionados foram revistos e a informação contida foi anotada em tabelas de Microsoft Excel de modo a organizar a informação quanto à identificação das proteínas identificadas, proveniência histológica da amostra, quantificação da alteração registada, desenho do estudo e respectivos critérios de inclusão/exclusão de indivíduos e hábitos sociais da população estudada.

3.2 Caracterização do Oraloma da DMT1 e DMT2

Após a revisão da literatura científica mais atual quanto às proteínas que se encontram alteradas na cavidade oral de um paciente diabético, foi necessário anotar, catalogar e integrar essa informação de modo a possibilitar o estudo *in silico* do oraloma do paciente diabético.

Foram utilizadas técnicas algébricas e computacionais para estudar o conjunto das proteínas encontradas e assim comparar de que forma, as mesmas, podem influenciar o ecossistema oral nos dois tipos de diabetes.

3.2.1 Anotação dos dados obtidos na revisão da literatura

Muita informação relevante, proveniente de estudos de proteómica, referente ao oraloma do paciente diabético, encontra-se dispersa. Sendo um dos objectivos do presente trabalho reunir e integrar esses dados por forma a conseguir estudá-los *in silico* e compreender em que nível o ecossistema oral espelha os mecanismos e condições patofisiológicas dos dois tipos de Diabetes Melitos.

Consequentemente, para efetuar este registo foi utilizado o software Microsoft Excel versão 14.0. Este software permite a realização de cálculos na própria folha de registo e possui uma vasta biblioteca de funções algébricas que podem ser utilizadas para o estudo dos valores observados.

O conjunto das proteínas em estudo foi organizado em tabela, onde se discriminaram diferentes características da proteína e do estudo que a identificou.

A informação anotada é idêntica à que é utilizada noutros trabalhos semelhantes por forma a standardizar a metodologia de recolha de informação e permitir a sua posterior inclusão no repositório do Oraloma humano, o OralCard.

Para registar os dados provenientes da revisão da literatura, utilizou-se o programa Microsoft Excel 14.0. Foi preenchida uma tabela-base de Microsoft Excel cujas colunas correspondem a entradas de formulário para preenchimento conforme a informação obtida.

Na figura 1 estão enumeradas as colunas utilizadas.

UniProtKB AC	Name	Parotid	Parotid exosome	SM/SL	Minor
1	1	2	2	2	2
Whole Saliva	Crevicular fluid	Mucosa	Tongue	Health	Disease (OMIM ID or Disease Database)
2	2	2	2	3	4
Disease (MeS H ID)	Regulation	Age Gro up	Gender	Social Habit s	Methods of sampli ng
4	5	6	6	6	7
Methods of analys is	Type of study	PTM	Biomarker	Citation (N CBI ID)	Obs
7	7	8	9	10	11

Figura 1 - - Campos de informação anotada manualmente para cada uma das proteínas identificadas. 1-identificação da proteína; 2-proveniência da proteína; 3-proteína presente em ind. saudáveis; 4- identificação da doença; 5-Regulação; 6- Caracterização da população estudada; 7- Metodologia do estudo; 8- proteína com modificações pós-transcricionais; 9- proteína identificada como biomarcador da patologia; 10 - Código NCBI do artigo, 11- Observações, informações adicionais.

Durante a revisão da literatura sempre que surge uma proteína digna de registo são preenchidos os campos representados na Fig. 1.

Inicia-se a anotação por identificar a proteína através do seu código unívoco, o código Uniprot KB⁵⁰ e o seu nome (Fig.1-1); regista-se igualmente a proveniência da amostra onde a proteína foi identificada e refere-se se existe informação se a proteína anotada se encontra em indivíduos saudáveis(Fig.1-2 e 3). De modo a corresponder a proteína anotada a uma patologia em específico preenchem-se ambos os códigos OMIM e MESH da doença(Fig.1-4). Se houverem dados concretos quanto à quantidade da proteína na amostra, anota-se o valor da regulação, cujo cálculo se encontra explicado no ponto seguinte (Fig.1-5). Interessa igualmente registar o tipo de população estudado no artigo de onde se retirou informação da proteína (Fig.1-6), assim como a sua metodologia de colheita e análise de amostras (Fig.1-7). É possível registar se a proteína anotada apresenta modificações pós-traducionais (Fig.1-8) ou se foi se foi sugerida como biomarcador para a

doença em estudo (Fig.1-9). Por último anota-se o código NCBI do artigo a partir do qual culminou a anotação (Fig.1-10) e, se necessário regista-se algum tipo de informação adicional não contemplado pelos campos anteriores, preenchendo-se o campo destinado a observações (Fig.1-11).

3.2.1.1 Cálculo da regulação da proteína

Nos estudos selecionados, cada proteína, na maior parte dos casos, foi analisada e quantificada tanto em diabéticos como no grupo controlo. De modo a quantificar a sua alteração, ou seja, a sua regulação, recorreu-se ao cálculo de "fold change". Este cálculo permite obter a variação de um valor inicial para um final, neste caso de um controlo saudável para um diabético tipo 1 ou tipo 2. Quando o resultado do "fold change" é inferior a 1, utiliza-se o negativo do seu inverso ou seja:

Se o controlo for 80 e o paciente diabético tiver 20 o "fold change" será:

$20/80 = 0,25$ o inverso do negativo significa que:

$$-(1/(20/80)) = -4$$

ou seja, 4 vezes menos. Este cálculo facilita a perceção da variação da quantidade (ou atividade) de uma proteína na doença em relação ao controlo saudável.

Este cálculo foi aplicado a todas as proteínas cujos estudos mencionavam valores do paciente diabético e do controlo.

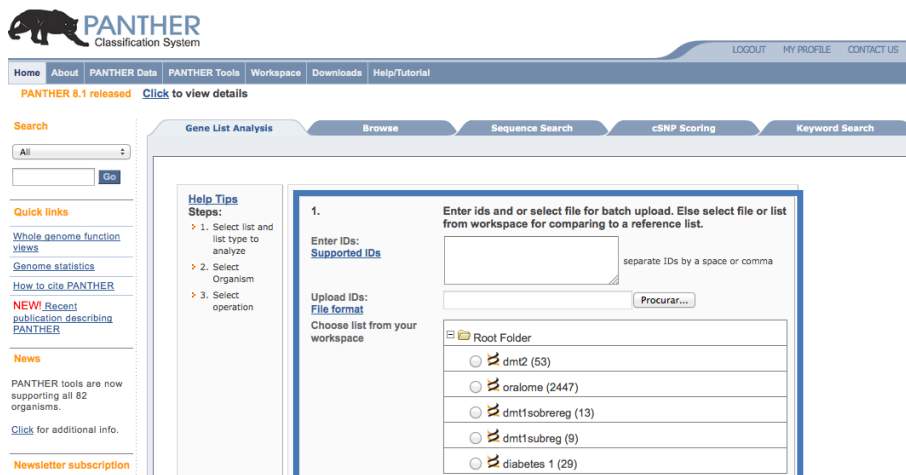
O "fold change" permite então a perceção e quantificação da alteração de uma proteína entre o controlo saudável e o paciente diabético, facilitando a interpretação das alterações moleculares observadas entre os estados de saúde e de doença.

3.2.2 Caracterização segundo ontologias

As proteínas estudadas foram classificadas quanto à sua função molecular, processos biológicos em que intervêm e vias de sinalização afectadas, através da ferramenta PANTHER^{19,51} (<http://www.pantherdb.org>). Esta ferramenta bioinformática possibilita a classificação de genes e proteínas de acordo com as funções que desempenham e a sua relação evolutiva, baseando-se em dados científicos experimentais publicados e pela inferência de revisores especializados, o que permite prever funções mesmo quando não haja evidência experimental direta.

Para tornar estas inferências o mais atualizadas e exatas possível, o PANTHER utiliza dados computacionais e revisão manual à medida que mais dados são gerados e acumulados.

O *input* de dados no PANTHER faz-se do respetivo código UniprotKB⁵⁰. É igualmente possível introduzir uma lista de proteínas introduzindo os respetivos códigos UniprotKB em simultâneo, estudando as proteínas por grupos (figura 2). Para este estudo foram criadas sete listas no PANTHER, uma com o total das proteínas anotadas no Oraloma e duas outras listas com as proteínas alteradas em pacientes com Diabetes tipo 1 e 2 (e respectivas listas das proteínas sub e sobre reguladas em cada tipo de Diabetes Melitos).



Campo de introdução dos códigos UniprotKB

Listas de códigos UniprotKB já criadas

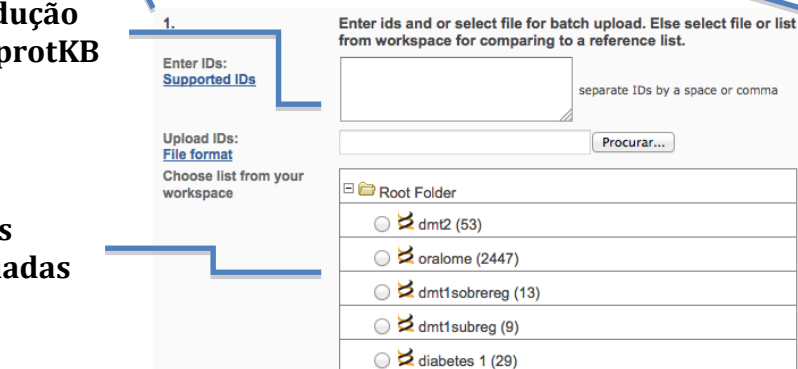


Figura 2 - Campo de introdução de dados por grupo no PANTHER.

3.2.2.1 Classificação segundo processos biológicos, funções moleculares e vias de sinalização

Após introdução dos códigos UniprotKB e as listas de cada tipo de Diabetes Melitos criadas recorre-se ao PANTHER para classificar cada grupo de proteínas (Oralome, Diabetes Melitos tipo 1, Diabetes Melitos tipo 2) de acordo com o processo biológico em que participam e com as funções moleculares que desempenham.

O mesmo procedimento foi utilizado para as 3 listas e começando-se por selecionar uma das listas. Tomemos como exemplo a Diabetes Melitos tipo 1. Após clicar em submeter, e de acordo com os critérios selecionados, o PANTHER irá gerar uma lista com todos os genes de onde as proteínas em estudo são provenientes e a informação quanto a funções moleculares e processos biológicos em colunas.

Nesta lista (Figura 3) existe a opção de mostrar a informação em gráfico circular e de acordo com várias ontologias (função molecular, processo biológico, classificação proteica, localização celular e via de

sinalização).

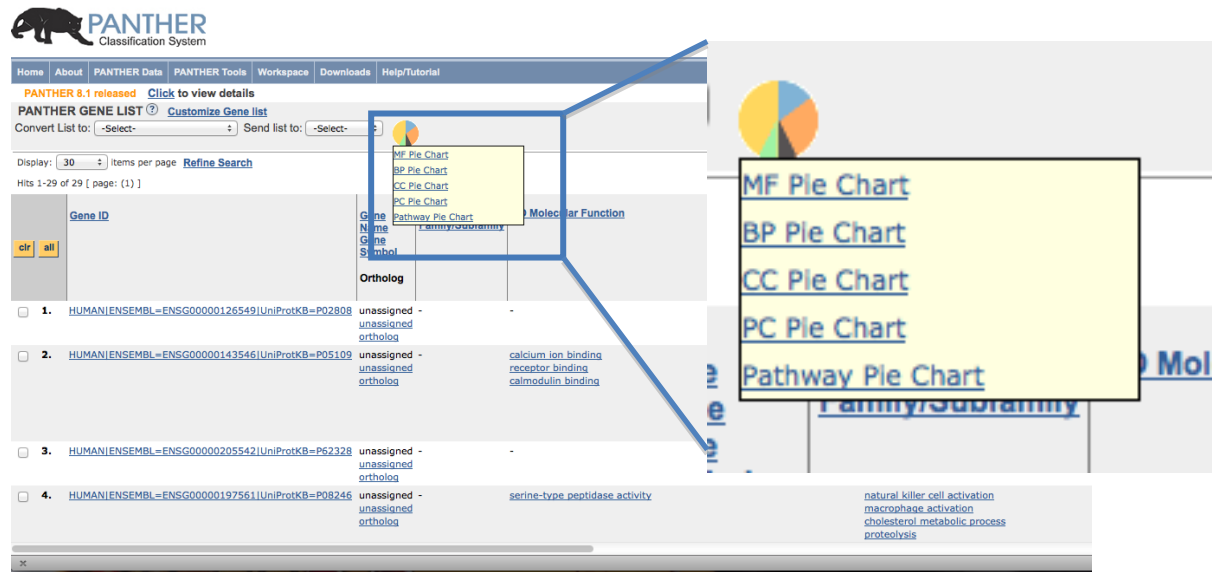


Figura 3 - Metodologia para criar gráficos circulares. MF- Molecular Functon, BP - Biological Process, CC - Celular Component, PC - Protein Class, utilizando a ferramenta PANTHER.

Quando já se encontra numa vista de gráfico circular pode-se alterar a ontologia como explicado na figura 4:

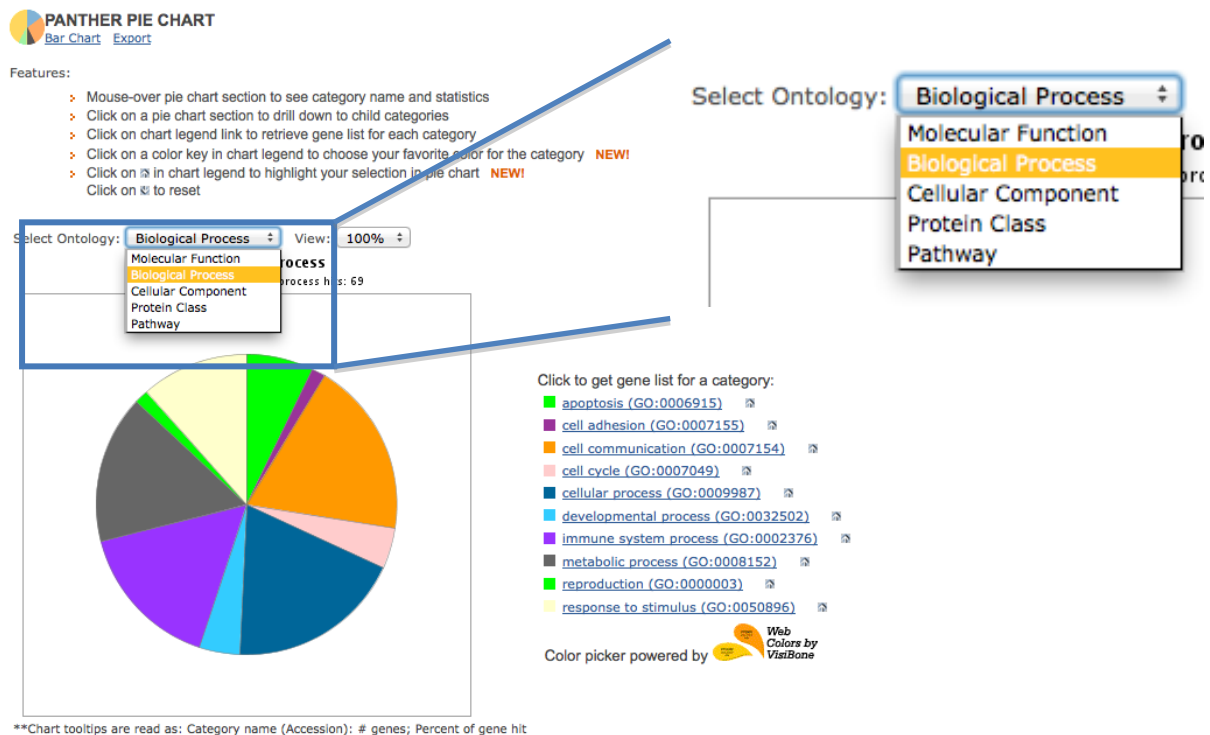


Figura 4 - Gráfico circular representando os processos biológicos onde estão presentes as proteínas alteradas nos pacientes com Diabetes Melitos tipo 1, segundo a ferramenta PANTHER.

Após gerar as listas no

PANTHER é possível exportar a informação relativa a cada uma das ontologias em ficheiro .txt; o conteúdo do ficheiro exportado é importado para uma folha de cálculo do Excel para posterior estudo.

3.2.3 Interpretação da Interactómica das proteínas alteradas

Após registar que proteínas se encontram alteradas nos dois tipos de Diabetes Melitos, em que funções moleculares e processos biológicos intervêm, interessa interpretar a rede interatómica formada por essas proteínas.

A interatómica é a ciência que estuda a relação e interação de biomoléculas entre si, neste caso: proteínas.

Existe uma ferramenta bioinformática, nomeadamente o STRING^{20,52-54}(<http://string-db.org/>), que permite inserir todos os códigos UniprotKB de cada tipo de Diabetes Melitos em simultâneo e gerar uma visualização esquemática da rede interatómica das proteínas em estudo.

O STRING (Figura 5) permite gerar estas redes de interatómica baseando-se em quatro fontes de informação:

- dados de genómica
- dados experimentais directos
- co-expressão
- text mining

Actualmente o STRING encontra-se na sua versão 9.05 e possui informação quanto a 5 214 234 proteínas provenientes de 1133 organismos.

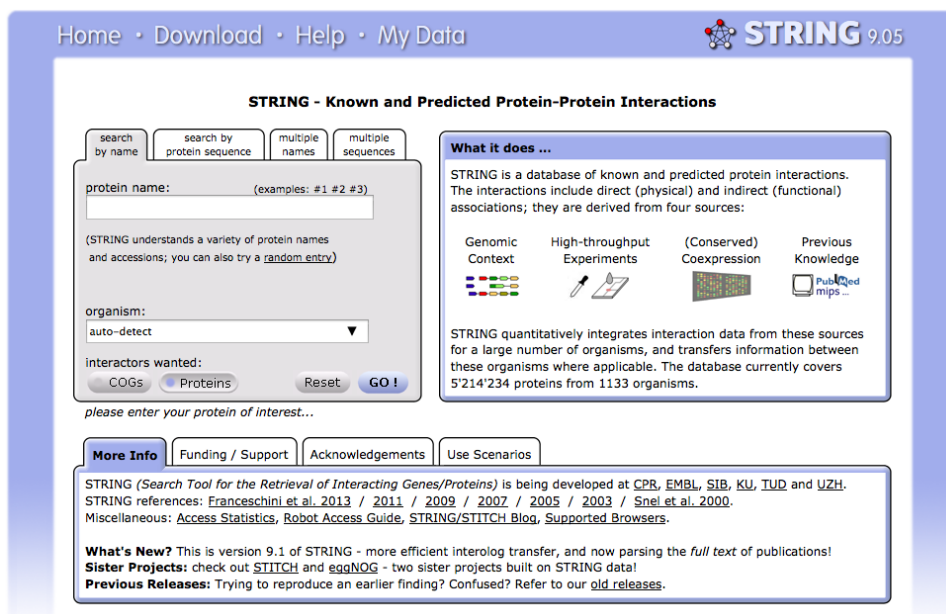


Figura 5 - Página de rosto da ferramenta bioinformática STRING, para estudos de interatômica

No separador "Multiple Names" (Figura 6) colocam-se todos os códigos Uniprot de um grupo de proteínas a estudar, neste caso a Diabetes Melitos 1 ou 2; introduzidos os códigos UniprotKB clica-se em "GO!".

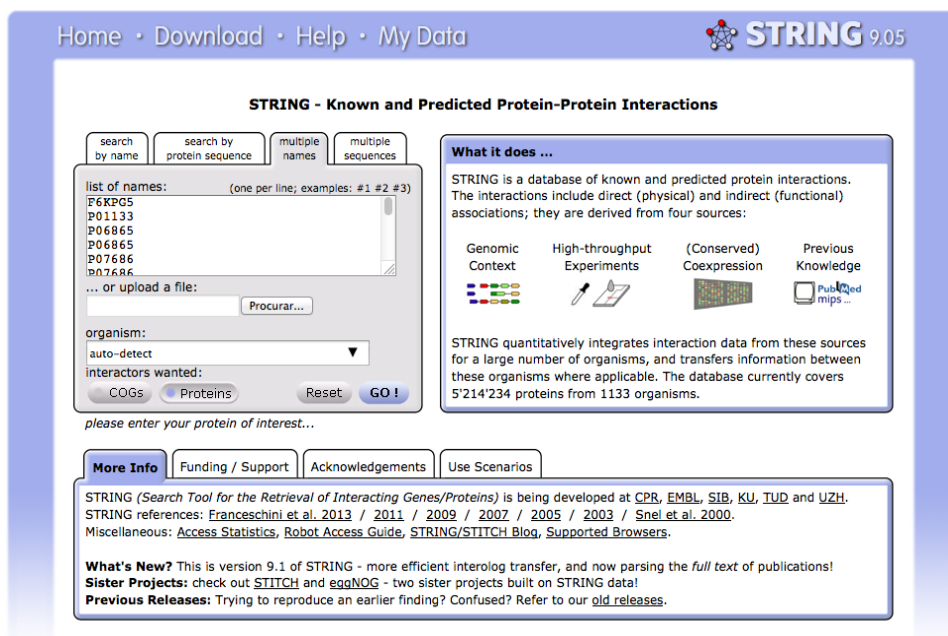


Figura 6 - Página de "input" da ferramenta bioinformática STRING mostrando a introdução das proteínas alteradas em Diabetes melitos Tipo 2.

Após clicar em "GO!" aparecerá a lista de todas as proteínas a integrar a rede de interatômica. Em caso de ambiguidade, terá de se proceder à identificação manual das proteínas.

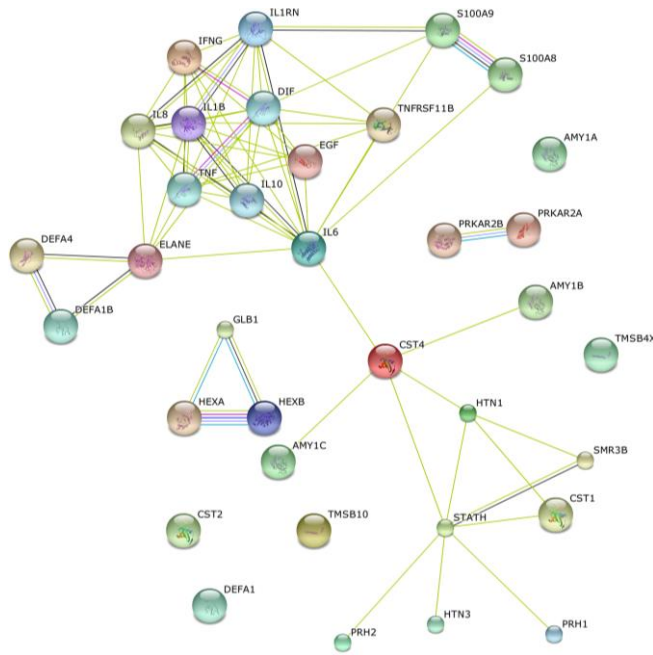


Figura 7 - Rede interatômica gerada no STRING, as diferentes cores das linhas representam as diferentes fontes de informação

interacção, cada cor das linhas corresponde a uma fonte de informação,

- Acção - cada cor de cada linha é um tipo de acção entre as duas proteínas.

Nas redes de interatômica geradas no STRING (Figura 7), as linhas que unem as proteínas podem ser alteradas de acordo com vários parâmetros:

- Confiança - as linhas que traduzam interacções de maior confiança surgem mais espessas que as de menor grau de confiança,
- Evidência - existe mais que uma linha para cada

O STRING disponibiliza funcionalidades que facilitam a interpretação dos dados de interatômica.

É possível evidenciar grupos de proteínas de acordo com ontologias tais como: função molecular, processo biológico, componente celular e via de sinalização. Outra funcionalidade disponível consiste no *clustering* que agrupa as proteínas de acordo com o seu *STRING global score*, ou seja, proteínas cujas interacções aparentam ser mais fidedignas. Os *clusters* ou grupos de proteínas podem ser modelados através de dois algoritmos, KMEANS e MCL, sendo que foi utilizado o algoritmo MCL que agrupa as interacções por "inflação" um parâmetro relativo à precisão do *clustering*.

3.2.4 Comparação entre os Oralomas da Diabetes Melitos tipo 1 e 2 e o total de anotações do Oralome

Após recolha dos dados referentes às 3 principais ontologias, funções moleculares, processos biológicos e vias de sinalização, é importante compará-los ao total de proteínas anotadas no Oralome.

Esta comparação permite determinar, com um intervalo de confiança específico, os valores obtidos com valores expectáveis se se verificasse uma proporção directa relativamente ao total de proteínas anotadas no Oralome e entre os dois tipos de Diabetes Melitos entre si. Esta comparação foi efectuada de igual forma tanto para a Diabetes Melitos tipo 1 como para a Diabetes Melitos tipo 2.

Para esta comparação anotaram-se os valores obtidos no PANTHER de cada item de cada ontologia em Microsoft Excel. Para cada um destes colocou-se o valor do total de anotações do Oralome e do verificado na DMT1 e na DMT2 lado a lado. Por cálculo de proporção directa, foi inferido o valor que seria de esperar para cada item se houvesse proporção directa entre as entidades comparadas.

Para quantificar a diferença entre os valores observados e os valores esperados para cada item, calculou-se a diferença fraccional que consiste em:

$$DF = \left(\frac{Z_t - \hat{Z}_t}{\hat{Z}_t} \right)$$

Em que Z_t representa o valor observado \hat{Z}_t o valor esperado e DF a diferença fraccional.

A diferença fraccional é, então, o valor cuja multiplicação pelo valor esperado traduz quanto deveria ser adicionado ou subtraído ao valor observado para igualar o valor teoricamente esperado.

Recorrendo a uma distribuição binomial para calcular a probabilidade de se observar um resultado tão extremo que contradiga o que se inferiu, calculou-se o *p-value*.

Quanto menor o p-value menor probabilidade do resultado apresentado ser devido à aleatoriedade. Consequentemente um resultado é tanto mais significativo quanto menor for o seu *p-value*.

3.2.5 Comparação da microflora oral da Diabetes Melitos tipo 1 e 2

Para comparar os microrganismos presentes na cavidade oral de pacientes com DMT1 e DMT2, começou-se por efectuar uma revisão bibliográfica de estudos de microbiologia oral.

Utilizou-se o repositório online de artigos científicos PubMed no dia 29/6/2013 com a seguinte fórmula de pesquisa:

((Micro*)OR(bacteria)) AND ((Oral) OR (saliv*)) AND ((type 1 diabetes mellitus) OR (DMT1)) - para a DMT1, obtendo 64 resultados;

((Micro*)OR(bacteria)) AND ((Oral) OR (saliv*)) AND ((type 2 diabetes mellitus) OR (DMT2))- para a DMT2, obtendo 186 resultados.

A informação seleccionada foi anotada em Microsof Excel 14.0 cujas colunas correspondem a entradas de formulário para preenchimento conforme a informação obtida. As colunas agruparam a informação por:

- NCBI Taxon ID
- Organism Name
- All Body subsites
- Regulation
- Citation (NCBI ID)
- Obs.

4 Resultados e Discussão

Da aplicação das metodologias descritas na secção Material e Métodos, obtiveram-se os resultados que apresentamos e discutimos nesta secção.

4.1 Revisão de literatura e anotação manual dos dados obtidos

A atualização do Oraloma da diabetes (secção 3.1) resultou na anotação de 29 novas proteínas no oraloma da Diabetes Melitos tipo 1²³⁻³⁴ e 58 novas proteínas no oraloma da Diabetes Melitos tipo 2^{17,23,35,37,38,46,47,55} (Anexos - Tabela 1 e 2); estes valores não coincidem com os valores analisados na caracterização segundo ontologias uma vez que de todas as proteínas anotadas no oraloma do paciente diabético existem certas proteínas que ainda não constam na base de dados do PANTHER.

Enquanto na Diabetes Melitos tipo 1 todos os estudos referidos utilizaram métodos de análise de amostras diferentes, na Diabetes Melitos tipo 2, 3 estudos quantificaram as proteínas com recurso ao teste bioquímico ELISA. Esta realidade evidencia a necessidade da elaboração de metodologias standardizadas no que concerne a análise de saliva e tecidos orais de modo a não prejudicar a validade dos dados obtidos quando relacionados entre estudos.

Tabela 1 - Proteínas que os oralomas dos dois tipos de Diabetes Melitos têm em comum

Cód. UniprotKB/Nome da proteína	Diabetes Melitos tipo 1	Diabetes Melitos tipo 2
P01133 Pro-epidermal growth factor	-1,2607	1,21
P07686 Beta-hexosaminidase subunit beta	-1,125 (non-smokers) 3,0 (smokers)	não quantificado
P04745 alpha-amylase	3,1407	4,02
O00300 Tumor necrosis factor receptor superfamily member 11B	-2,5691	+
P05231 Interleukin-6	29,1667	0,00
P08246 Neutrophil elastase	1,0635	Não quantificado
P01036 Cystatin-S	Não quantificado	-2,44
P01037 Cystatin-SN	Não quantificado	-4,27
P02808 Statherin diphosphorylated	-3,11	Não quantificado
P02810 Salivary acidic proline-rich phosphoprotein	-2,21	Não quantificado
P06702 Protein S100-A9	1,56	+

Na tabela 1 é possível verificar que apesar dos dois tipos de Diabetes Melitos possuírem proteínas em comum, estas podem apresentar regulações diferentes. O facto de possuírem regulações díspares pode consistir *per se* numa diferença, contudo é necessário ter em conta que existem outras variáveis que influenciaram estes valores, os estudos não seguem uma metodologia de colheita e análise comum dado não existir qualquer standardização metodológica para a colheita e análise de amostras de tecidos e fluídos da cavidade oral.

4.1.1 OralOma da Diabetes Melitos tipo 1

Antes do presente estudo haviam sido anotadas no Oralome 14 proteínas, a revisão de literatura efectuada possibilitou o registo de mais 19

proteínas (em 22 anotações), perfazendo um total de 29 proteínas anotadas. Deste conjunto de proteínas, 21 provêm da saliva total, 8 de amostras da mucosa, 3 de amostras da glândula parótida e 1 oriunda do fluido crevicular (figura 8).

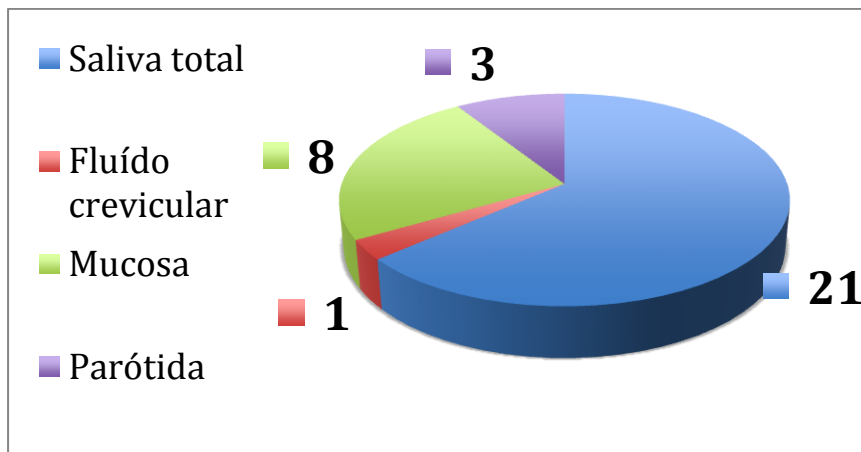


Figura 8 - Proveniência histológica das proteínas alteradas em casos de Diabetes Melitos tipo 1

4.1.2 Oraloma da Diabetes Melitos tipo 2

Foram adicionadas 58 proteínas ao oraloma do paciente com Diabetes Melitos tipo 2 que antes deste estudo já contava com 445 proteínas anotadas no Oralome. O universo de proteínas do oraloma da Diabetes Melitos tipo 2 é composto por 493 proteínas oriundas de amostras de saliva, 6 proteínas são provenientes de amostras da glândula parótida e 4 das glândulas submandibulares/sublinguais (figura 9).

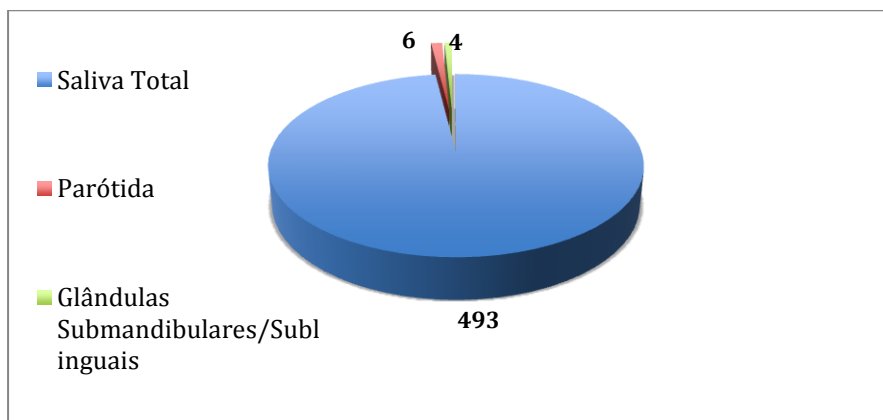


Figura 9 - proveniência das proteínas alteradas em casos de Diabetes Melitos tipo 2

A maioria das proteínas anotadas provêm de estudos de proteômica que utilizaram a saliva como amostra. A saliva acaba por conter proteínas originárias de diversos tecidos e fluídos uma vez que contacta com todas as

estruturas orais e possui o contributo do fluído crevicular que sofre, por sua vez, influência directa do sangue por intermédio dos exsudados da microcirculação do sulco gengival conferindo à saliva capacidade de reproduzir doenças sistémicas e não apenas da cavidade oral.

4.1.3 Metodologia dos estudos seleccionados na revisão da literatura

Das 33 anotações referentes à Diabetes Melitos tipo 1, 14 são resultado de estudos efectuados em crianças (sem especificar um intervalo de idades), 4 anotações provêm de estudos efectuados em indivíduos entre os 40 e os 58 anos de idade; o artigo que quantificou os níveis de elastase compreendeu indivíduos entre os 26 e os 51 anos; os estudos dos quais resultaram as restantes anotações envolveram indivíduos com idade inferior a 20 anos. A faixa etária tendencialmente mais jovem dos indivíduos estudados por cada autor justifica-se dado o *onset* da Diabetes Melitos tipo 1 ocorrer nessas mesmas idades.

No que concerne a regulação das proteínas anotadas em casos de Diabetes 1, verificam-se, no caso da hexosaminidase (subunidade A e B) e da Beta-Galactosidase valores de regulação diferentes sejam os indivíduos estudados fumadores ou não²⁶. A regulação que registou o valor mais elevado foi referente à Interleucina-8 (regulação: 35)²⁷ seguida da Interleucina-6 (regulação: 29)²⁷; a anotação com o valor mais baixo em termos de regulação pertence à Histatina-1 (Regulação: -3,14738)¹⁵.

À excepção de um estudo que compreendeu indivíduos com Diabetes Melitos tipo 2 dos 18 aos 66 anos, todos os estudos que quantificaram as proteínas alteradas em casos de Diabetes Melitos tipo 2 utilizaram populações de indivíduos com idades não inferiores a 30 anos. Este facto corrobora a informação que estabelece que o *onset* e diagnóstico da Diabetes Melitos tipo 2 ocorre geralmente na idade adulta.

A proteína Elongation factor G, mitochondrial (Q6CRY5, regulação: 702,46)⁵⁵ foi a proteína com a regulação mais elevada, ao passo que a proteína FAM92A1 registou o valor mais baixo de regulação (regulação: -91,53)⁵⁵.

Outro dos obstáculos à obtenção, por meio de estudo *in silico*, de dados estatísticos com significância, é a quantidade de proteínas anotadas em Diabetes Melitos tipo 1 (33 proteínas) ser diminuto quando comparado ao Oralome total (4376 proteínas) e mesmo ao Oraloma de Diabetes Melitos tipo 2 que compreende 503 anotações. Urge, pois, desenvolver mais estudos de proteômica no sentido de identificar as proteínas orais alteradas em DMT1 relativamente a indivíduos saudáveis.

4.2 Caracterização do Oraloma do paciente diabético

4.2.1 Caracterização segundo Ontologias génicas

Por forma a analisar que funções moleculares possuem, em que processos biológicos intervêm e que vias de sinalização afectam, as proteínas alteradas em ambos os tipos de Diabetes foram caracterizadas de acordo com ontologias génicas. As ontologias génicas não irão ser traduzidas ao longo do presente trabalho de modo a evitar deturpar o seu significado biológico.

Para melhor comparar os dois tipos de Diabetes Melitos, recorreu-se a um cálculo de diferença fraccional, tendo por base a Diabetes Melitos tipo 2 dado esta possuir um maior número de proteínas anotadas. Este cálculo traduz a diferença entre quantas proteínas do Oraloma da Diabetes Melitos tipo 1 seriam expectáveis e as que foram anotadas na realidade em cada categoria ontológica, caso exista proporcionalidade directa entre a Diabetes Melitos tipo 1. Com recurso a uma distribuição binomial foi calculado o *p-value* em cada diferença fraccional de modo a poder atribuir um grau de significância estatística a cada resultado (Anexo 3)

4.2.1.1 Funções Moleculares

Os oralomas dos dois tipos de Diabetes Melitos apresentam 4 tipos de funções moleculares comuns (Figura 10).

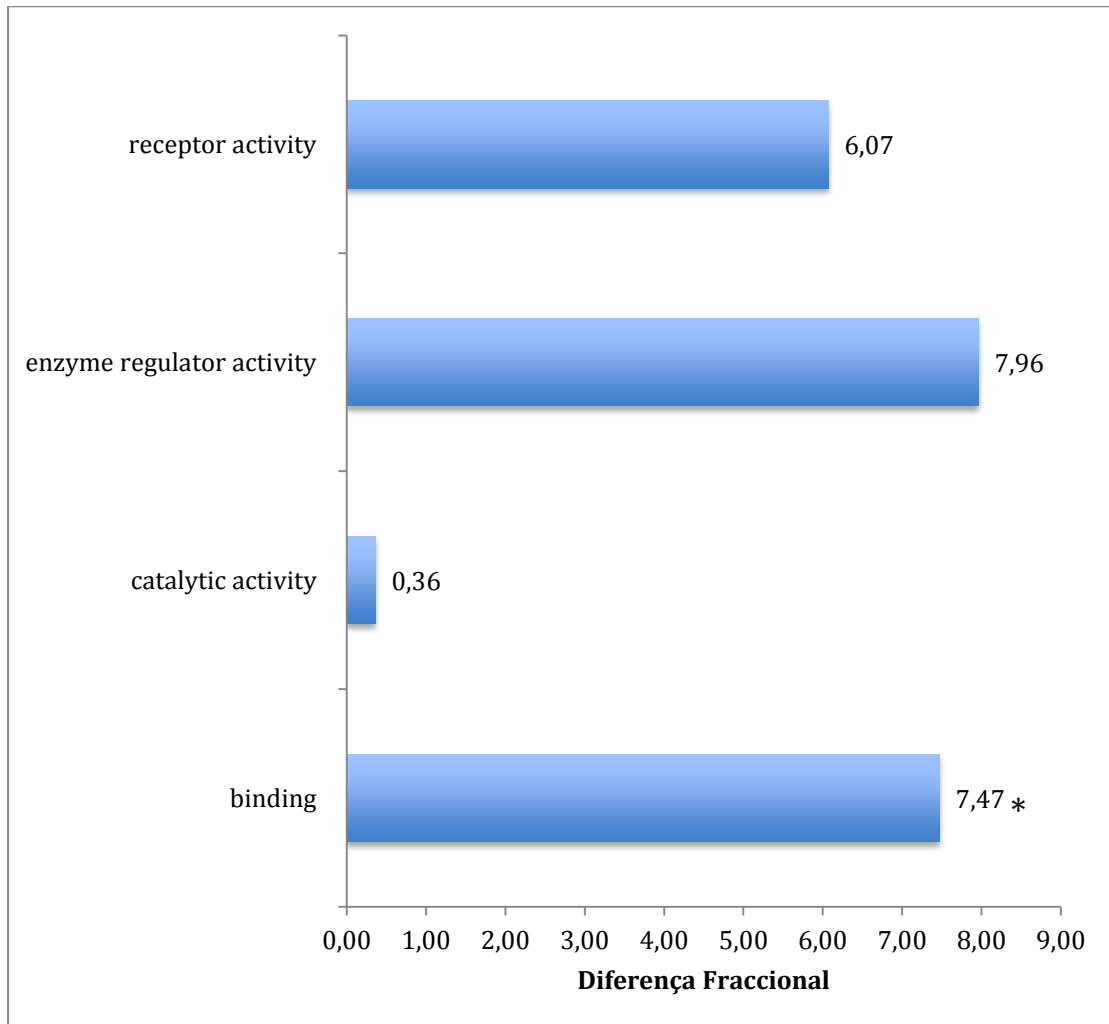


Figura 10 - Diferença fraccional do oraloma da DMT1 em relação ao oraloma da DMT2, estão apenas representadas as funções moleculares comuns entre os dois oralomas (* valores com $p\text{-value} < 0,05$)

A função molecular *binding* é uma função vasta, que pode englobar proteínas que com alguma probabilidade não se enquadram apenas nesta função molecular. Contudo, analisando as suas sub-funções, é possível denotar diferenças entre as proteínas implicadas na função de *binding* entre os dois oralomas (Figura 11). As 15 proteínas envolvidas em *binding* no oraloma da diabetes Melitos tipo 1 são essencialmente citocinas e proteínas envolvidas na ligação a cálcio, ao passo que a função molecular de *binding* compreende 125 proteínas do oraloma da Diabetes Melitos tipo 2 que consistem não só em citocinas como também em proteínas de sinalização intracelular. No entanto, tendo em conta a redundância desta função molecular e não obstante o $p\text{-value}$ da sua diferença fraccional entre os

oralomas dos dois tipos de Diabetes Melitos ser inferior a 0,05, esta é pouco informativa como parâmetro comparativo entre estas patologias.

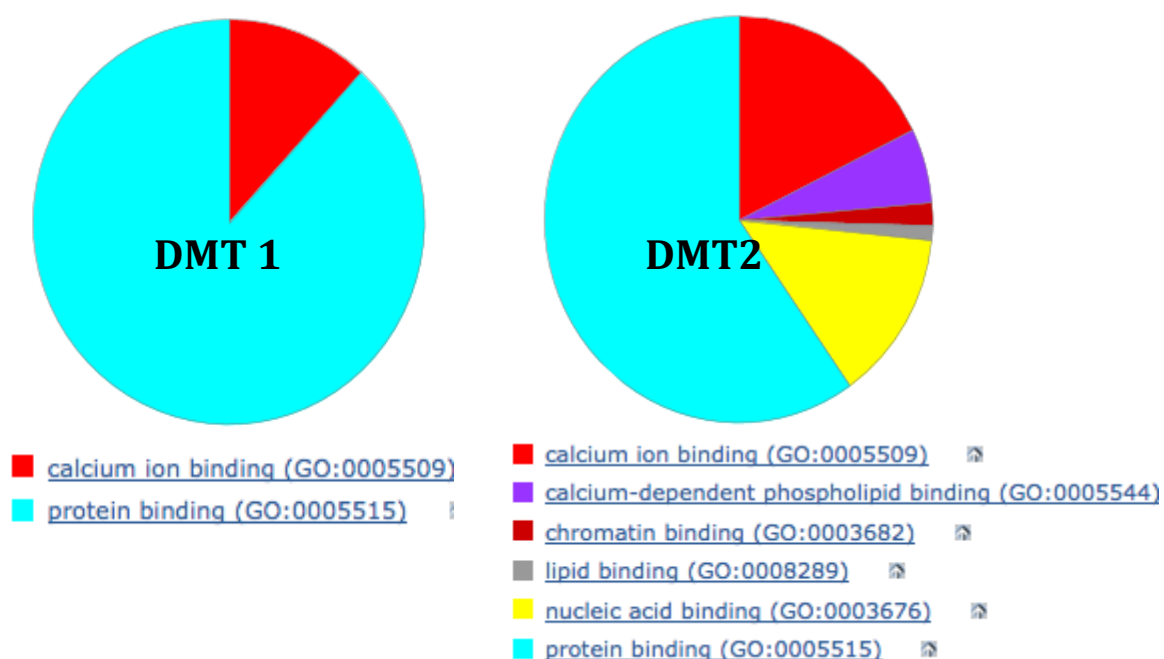


Figura 11 - Funções moleculares contidas na função molecular de *binding* dos oralomas dos dois tipos de Diabetes Melitos (gráfico adaptado de <http://www.pantherdb.com>).

Quanto à função molecular de *catalytic activity* no oraloma de Diabetes Melitos tipo 1 apenas é representada por 3 proteínas enquanto que no oraloma da Diabetes Melitos tipo 2 é desempenhada por 159 proteínas.

Outra função molecular comum entre os oralomas dos dois tipos de Diabetes Melitos é a de *enzyme regulator activity*. A DMT1 apresenta mais proteínas envolvidas nesta função molecular do que seria de esperar caso houvesse proporção à DMT2, isso traduz-se numa diferença fraccional de 7,96. A função molecular de *enzyme regulator activity* nos oralomas dos dois tipos de Diabetes Melitos consiste em funções de fosforilação de substratos por transferência de grupos fosfato a partir de ATP e noutras funções que advêm da gluconeogénese ou glicogenólise⁷.

À semelhança do verificado na função de *enzyme regulator activity*, existem igualmente mais proteínas no oraloma de Diabetes Melitos tipo 1 a desempenhar a função de *receptor activity* do que seria expectável caso se verificasse proporcionalidade entre os oralomas dos dois tipos de Diabetes Melitos. No oraloma de Diabetes Melitos tipo 1 existem 3 proteínas a

desempenhar esta função molecular, uma moduladora de receptor de factores de necrose tumoral, um factor de necrose tumoral e um factor de crescimento epidermal; no oroloma de Diabetes Melitos tipo 2 são 30 as proteínas que desempenham esta função as quais compreendem processos de regulação de receptores, processos imunológicos e de regulação da cascata complemento.

Todas as funções moleculares desempenhadas pelo Oroloma da Diabetes Melitos tipo 1 também são efectuadas pelo oroloma da diabetes Melitos tipo 2 sendo que este possui outras funções moleculares tais como *antioxidant activity*, *ion channel activity*, *structural molecule activity*, *transcription regulator activity*, *translator regulator activity* e *transporter activity*.

Apesar das diferenças descritas para esta ontologia é preciso ter em conta o facto que em proporção o oroloma descrito para a Diabetes Melitos tipo 2 ser substancialmente maior do que o descrito para a Diabetes Melitos tipo 1.

4.2.1.2 Processos Biológicos

A ontologia referente aos processos biológicos classifica os orolomas dos dois tipos de Diabetes Mellitus quanto aos processos biológicos por eles influenciados sendo que consiste na ontologia que providencia mais pontos de comparação entre os orolomas dos dois tipos de Diabetes Mellitus.

O oroloma da DMT1 contém proteínas que participam em 10 processos biológicos ao passo que o oroloma da DMT2 inclui proteínas que participam em 16 processos biológicos.

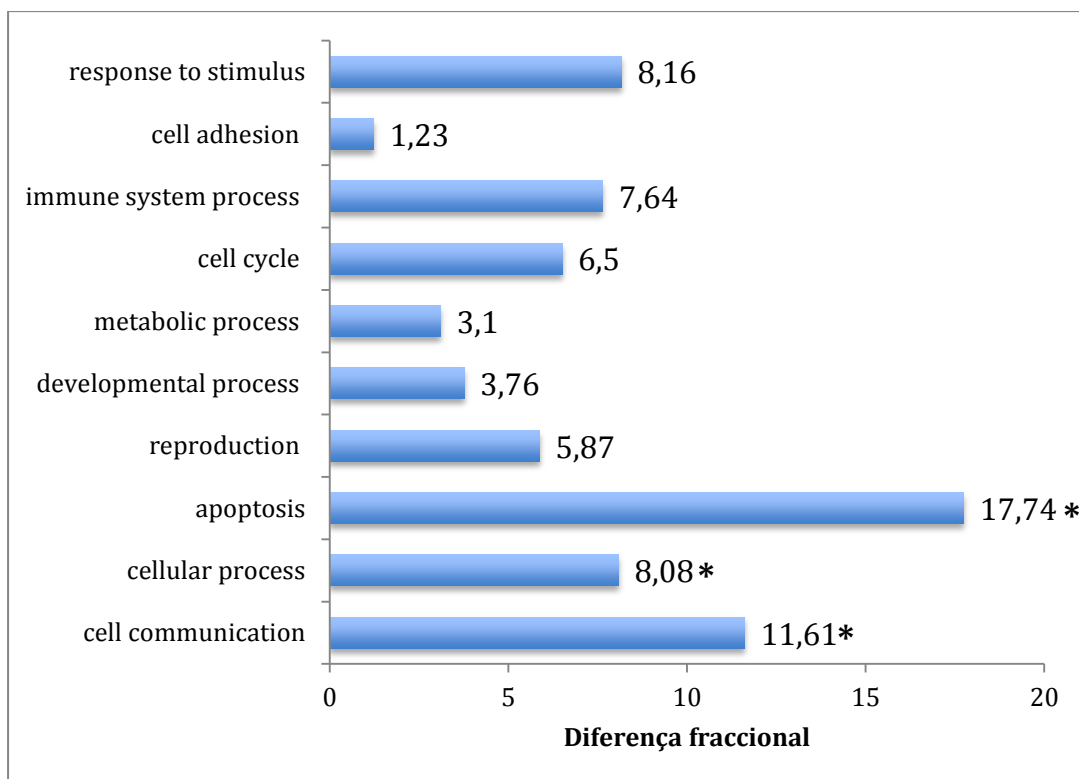


Figura 12 - Diferença fraccional do oroloma da DMT1 em relação ao oroloma da DMT2, estão apenas representadas os processos biológicos comuns entre os dois orolomas (* valores com $p\text{-value}<0,05$)

A ontologia referente aos processos biológicos classifica os orolomas dos dois tipos de Diabetes Mellitus quanto aos processos biológicos por eles influenciados sendo que consiste na ontologia que providencia mais pontos de comparação entre os orolomas dos dois tipos de Diabetes Mellitus.

O oraloma da DMT1 contém proteínas que participam em 10 processos biológicos ao passo que o oraloma da DMT2 inclui proteínas que participam em 16 processos biológicos.

Quando comparados, os dois oralomas influenciam 10 processos biológicos em comum, ou seja, todos os processos influenciados pelo oraloma da DMT1 são igualmente influenciados pelo oraloma da DMT2 (Figura 12). Contudo, a comparação entre os processos biológicos influenciados é estatisticamente significativa, ou seja, apresenta um *p-value* inferior a 0,05 em apenas 3 processos biológicos.

Todos os processos biológicos possíveis de comparar entre os dois oralomas demonstraram que, face ao valor esperado tomando o oraloma da DMT2 como referência e partindo do princípio que existe proporcionalidade entre eles, o oraloma da DMT1 apresenta mais proteínas a influenciar cada processo biológico.

O processo biológico de *cell communication* apresenta uma diferença fraccional de 11,61 e *p-value* inferior a 0,05. Este processo biológico é principalmente influenciado pelas citocinas do oraloma da DMT1 que influenciam, entre outros, dois sub-processos biológicos como a *intracellular signaling cascade*, que por sua vez compreende a *JAK-STAT cascade* e *calcium-mediated signaling*, e a cascata de sinalização JNK pertencente à sinalização por MAP-cinases que é um agonista da apoptose^{56,57}. Os níveis elevados de glicose culminam na produção de espécies de oxigénio reactivas que activam a cascata de sinalização JAK-STAT; esta via de sinalização induz a produção de *Tumor Growth Factor-beta* e de proteína da matriz extra-celular como a *fibronectin* e *collagen IV*⁵⁸. As proteínas JAK são activadoras dos receptores membranares de citocinas e, na presença do ligando, são fosforiladas, desencadeando as STAT's que por sua vez aumentarão a transcrição de certas sequências de ADN que influenciarão a apoptose, proliferação e crescimento celular. O oraloma da DMT2 influencia este processo biológico também por influenciar, entre outras cascatas de sinalização, a cascata de sinalização JAK-STAT e MAPKKK^{58,59}.

O processo biológico *cellular process* abrange os processos do ciclo de vida celular como a mitose, motilidade, adesão, citocinese e a acima referida comunicação celular. Por abranger este último processo, a

comunicação celular, que por si também se encontra aumentado no oraloma da DMT1 face ao oraloma da DMT2, é plausível que o processo biológico *cellular process* apresente também uma diferença fraccional positiva de 8,08 com *p-value* inferior a 0,05. Contudo este processo biológico é redundante dado abranger outros processos biológicos do mesmo nível como a *cell communication*, *cell adhesion* e *cell cycle*, e conseqüentemente não se apresenta como um bom parâmetro comparativo entre os oralomas da DMT1 e DMT2.

O valor mais elevado de diferença fraccional entre os oralomas dos dois tipos de Diabetes Melitos corresponde ao processo biológico de *apoptosis* que apresenta uma diferença fraccional de 17,74. Este valor de diferença fraccional é estatisticamente significativo uma vez que apresenta um *p-value* inferior a 0,05. É expectável que o processo biológico de *apoptosis* apresente tal diferença fraccional dado a DMT1 ter características autoimunes, indutoras de apoptose a células do organismo, maioritariamente às células β pancreáticas^{6,60}.

Dos processos biológicos comparados, 7 comparações não apresentam significância estatística. Na base de tal facto é provável que esteja a reduzida dimensão do oraloma da DMT1.

Os processos biológicos *immune system process* e *response to stimulus* são maioritariamente representados pelas citocinas e factores de necrose tumoral dos oralomas dos dois tipos de Diabetes Melitos.

4.2.1.2.1 Processos biológicos afectados exclusivamente pelo oraloma da DMT2

Todos os processos biológicos representados no oraloma da DMT1 estão também representados no oraloma da DMT2. Por outro lado, o oraloma da DMT2 inclui proteínas envolvidas em 5 processos biológicos de forma exclusiva, nomeadamente os processos de *localization*, *transport*, *system process*, *homeostatic process* e *generation of precursor metabolites and energy*. Tal pode ser explicado pelo reduzido oraloma da DMT1, dado que os processos biológicos enumerados estarão, de acordo com a patofisiologia da Diabetes Melitos, alterados em ambos os tipos de Diabetes Melitos⁷.

4.2.1.3 Caracterização das vias de sinalização afectadas

Por último, os oralomas dos dois tipos de Diabetes Melitos foram comparados na ontologia de vias de sinalização (Figura 13). A este nível o oraloma da DMT1 abrange 21 vias de sinalização, ao passo que o oraloma da DMT2 compreende 62 vias de sinalização, entre os dois oralomas existem 9 vias de sinalização em comum que, quando comparadas desta forma, 7 apresentam um *p-value* inferior a 0,05.

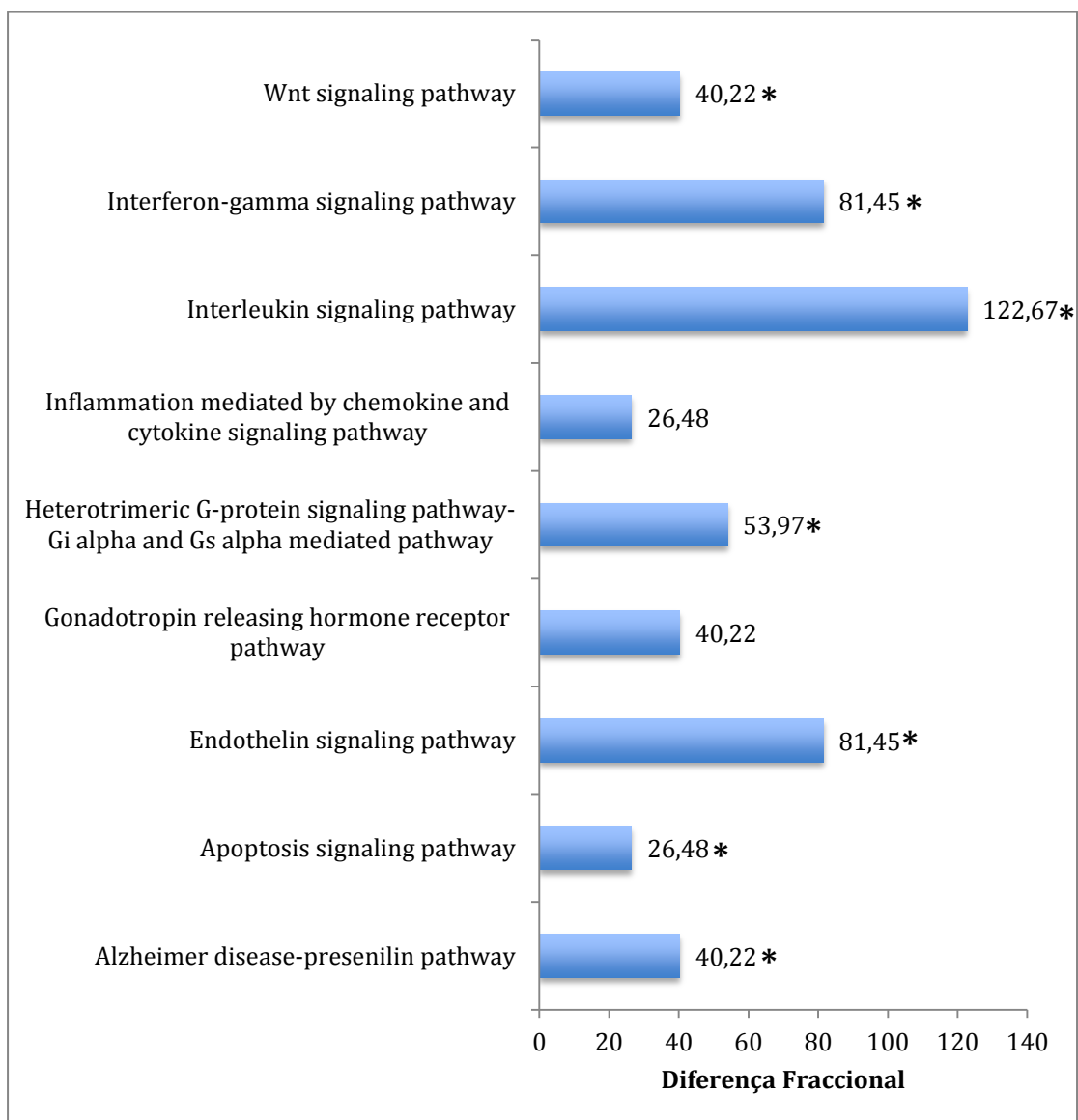


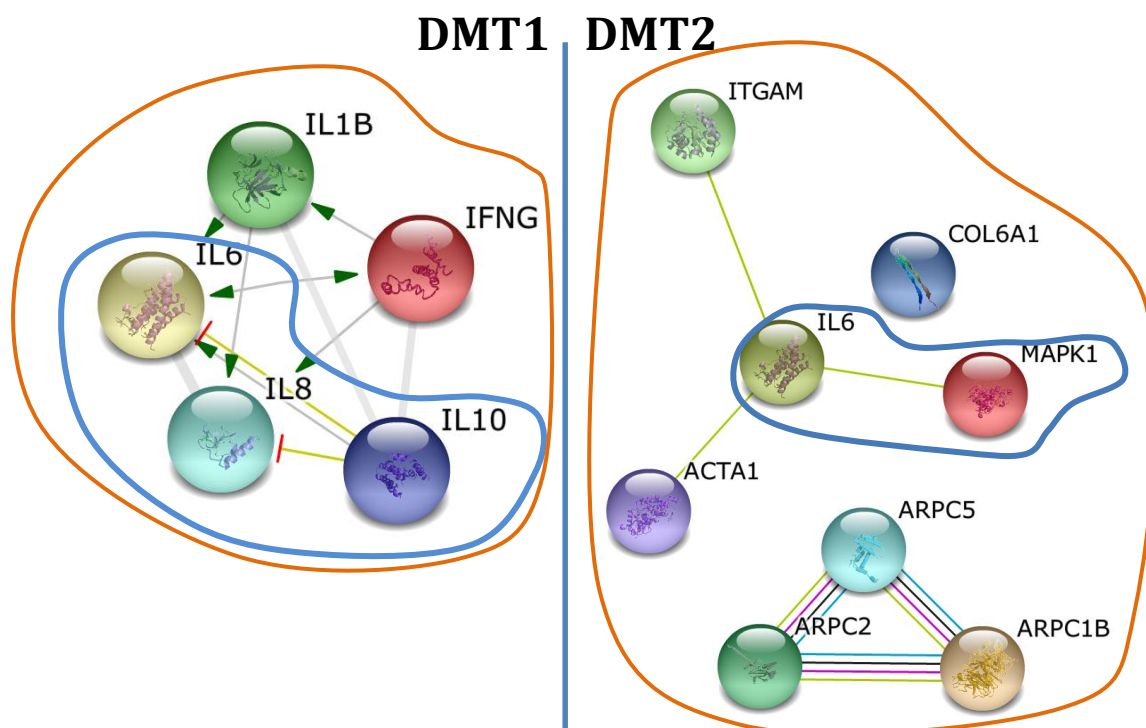
Figura 13 - Diferença fraccional entre os oralomas dos dois tipos de Diabetes Melitos quanto à ontologia de vias de sinalização (* valores com *p-value*<0,05)

A via de sinalização *Wnt signaling pathway* pode subdividir-se em três tipos que regulam desde a transcrição génica, a forma da célula e os níveis de cálcio intracelulares. Não obstante, o factor de transcrição TCF7L2, componente desta via de sinalização, foi identificado como factor de risco para a Diabetes Melitos tipo 2, sendo que esta via de sinalização influencia o desenvolvimento do pâncreas endócrino e modula a secreção de insulina, a sobrevivência e a proliferação das células- β do pâncreas e a adipogénese⁶¹⁻⁶⁴, a diferença fraccional apresentada (40,22) pode sugerir uma sobre-expressão das proteínas desta via por forma a colmatar a perda de células- β do pâncreas.

O interferão-gama é uma citocina pleiotrófica que desempenha funções cruciais ao nível da imunidade intracelular contra patógenos e tumores. Esta citocina é maioritariamente produzida por células *Natural Killer* e *Natural Killer T* no domínio na imunidade inata, contudo esta molécula desempenha funções na imunidade adquirida sendo secretada por células Th1 CD4 e CD8⁶⁵. O interferão gama produz efeitos tanto por activação das cinases da cascata de sinalização JAK-STAT como por outras vias de sinalização, o balanço entre o efeitos desta citocina entre a via de sinalização dependente ou independente da STAT1 é que determina a resposta biológica ao interferão gama⁵⁹. A sinalização mediada por interferão gama está, comparativamente ao oraloma da DMT2, consideravelmente aumentada no oraloma da DMT1, dado expectável uma vez tratar-se de uma doença auto-imune e o interferão gamma ser uma citocina sobre-regulada neste tipo de doenças⁶⁶.

Da mesma forma que a sinalização mediada por interferão a, mais abrangente, sinalização mediada por interleucinas é a via de sinalização mais aumentada no oraloma da DMT1 face ao oraloma da DMT2.

Atendendo ao facto destas vias de sinalização posuírem proteínas em comum entre si, representaram-se num mapa de interatómica como na figura 14.



Conjunto delimitado por - *Inflammation mediated by chemokine and cytokine signaling pathway*
 Conjunto delimitado por - *Interleukin signaling pathway*

Figura 14 - Rede interatómica das proteínas envolvidas nas vias de sinalização de *Inflammation mediated by chemokine and cytokine signaling pathway* e *interleukin signaling pathway*, nos oralomas dos dois tipos de Diabetes Melitos. Rede determinada com recurso à ferramenta STRING. Confidence>0,7

A *Interleukin-6* é uma citocina com variadas implicações fisiológicas entre as quais a resistência à insulina, derivado dos seus efeitos inibitórios na transcrição génica de *IRS-1* e *GLUT-4*, receptores de insulina⁶⁷. Consequentemente, é crucial referir que no oraloma da DMT2 o único estudo que quantificou a expressão de *Interleukin-6* registou uma regulação de 0¹⁷, ao passo que o estudo que quantificou a *interleukin-6* no oraloma da DMT1 registou uma variação de 29,17²⁷. A literatura actual não é consensual quanto à IL-6, havendo autores que quantificaram a IL-6 sérica como normal ou diminuída^{68,69}, embora hajam outros autores a quantificar a mesma como aumentada e relacionada com a prévia hiperglicemia e a progressão de complicações microvasculares diabéticas^{70,71}.

A via de sinalização da apoptose é influenciada apenas pelo Tumour Necrosis Factor-alpha no oraloma da DMT1 e por 3 proteínas (Cathepsin G, MAPK1 e uma subunidade da Hsp70). Apesar de ser uma comparação com p-value inferior a 0,05 a reduzida quantidade de proteínas nos oralomas dos

dois tipos de Diabetes Melitos, não permite inferir nada não sendo um termo de comparação válido entre a DMT1 e DMT2 até haverem mais estudos de proteômica que quantifiquem mais proteínas nesta via de sinalização, o mesmo se aplica às vias de sinalização *Heterotrimeric G-protein signaling pathway-Gi alpha and Gs alpha mediated pathway*, *endothelin signaling pathway*, *alzheimer disease-presenilin pathway* e à *Gonadotropin releasing hormone receptor pathway*, embora esta última com p-value superior a 0,05.

4.2.2 Comparação do oraloma do paciente diabético com o total de anotações do Oralome

Neste estudo comparativo, interessa relacionar o observado, ou seja, as proteínas anotadas nos dois tipos de Diabetes Melitos com o total de anotações em pacientes saudáveis (oraloma normal). Para tal foi utilizado uma vez mais o cálculo de diferença fraccional (Anexo 4 e 5).

4.2.2.1 Processos Biológicos

Do estudo comparativo da ontologia gênica de processos biológicos, verifica-se que apenas 3 resultados em 9 no oraloma da DMT1 e 4 resultados em 16 no oraloma da DMT2 apresentam significância estatística (Fig. 15).

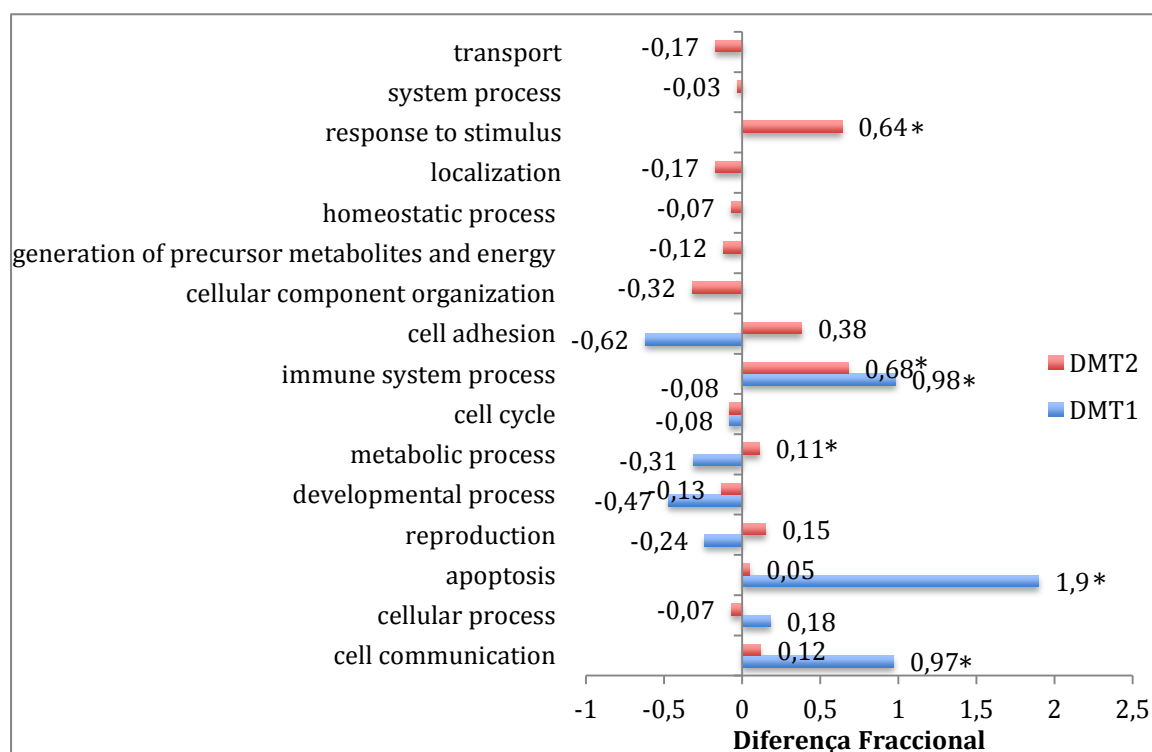


Figura 15 - Diferença fraccional entre os oralomas dos dois tipos de Diabetes Melitos e o de indivíduos saudáveis, quanto à ontologia de processos biológicos (* valores com $p\text{-value} < 0,05$)

Do estudo comparativo da ontologia génica de processos biológicos, verifica-se que apenas 3 resultados em 9 no oraloma da DMT1 e 4 resultados em 16 no oraloma da DMT2 apresentam significância estatística (Fig. 15).

Considerando apenas os processos biológicos que apresentam *p-value* inferior a 0,05, temos que os processos biológicos mais alterados no oraloma da DMT1 são os de *cell communication*, *apoptosis* e *immune system process*; ao passo que no oraloma da DMT2 consistem nos processos biológicos de *cell adhesion*, *immune system process*, *metabolic process* e *response to stimulus* (este último sendo mais vago uma vez que engloba, entre outros, o já referido processo biológico de *immune system process*).

A comparação entre o total de proteínas anotados em indivíduos saudáveis e o oraloma dos dois tipos de Diabetes Melitos ao nível da ontologia de processos biológicos, permite concluir que os processos biológicos alterados que apresentam significância estatística corroboram certos aspectos da patofisiologia dos dois tipos de Diabetes Melitos e distinguem-nos das restantes patologias anotadas no Oralome. Alguns processos biológicos estão aumentados num dos tipos de Diabetes Melitos e diminuídos noutro, como é o caso dos processos biológicos:

- *Metabolic process*, com uma diferença fraccional de 0,11 na DMT2 e -0,31 na DMT1
- *apoptosis*, que apresenta uma diferença fraccional de 0,05 na DMT2 e 1,9 na DMT1
- *cell communication*, que regista uma diferença fraccional de 0,12 na DMT2 e 0,97 na DMT1

considerando apenas os processos biológicos em que pelo menos uma das diferenças fraccionais apresenta *p-value*<0,05.

4.2.2.2 Funções Moleculares

As funções moleculares desempenhadas pelas proteínas do oraloma dos dois tipos de Diabetes Melitos estão todas alteradas em relação ao total de proteínas anotadas em indivíduos saudáveis (oraloma normal) (Fig. 16).

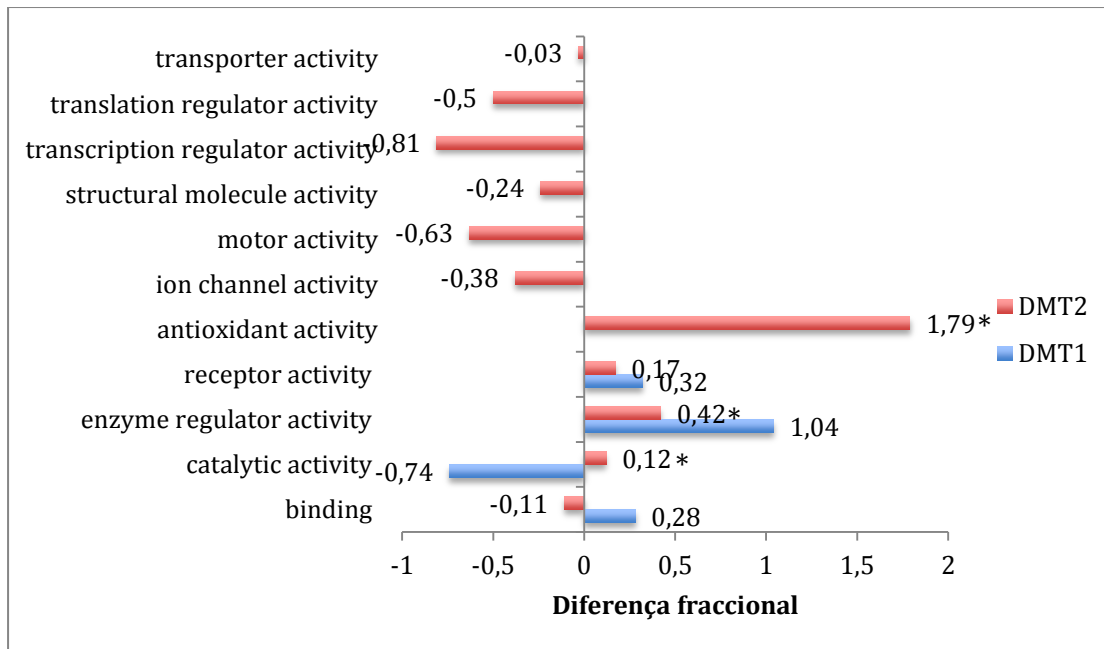


Figura 16 - Diferença fraccional entre os oralomas dos dois tipos de Diabetes Melitos e o de indivíduos saudáveis, quanto à ontologia de funções moleculares (* valores com $p\text{-value} < 0,05$)

As funções moleculares desempenhadas pelas proteínas do oraloma dos dois tipos de Diabetes Melitos estão todas alteradas em relação ao total de proteínas anotadas em indivíduos saudáveis (oraloma normal) (Fig. 16).

Ao nível da ontologia génica de funções moleculares, a comparação estatística entre o total de proteínas anotadas em indivíduos saudáveis e na DMT1, não é estatisticamente significativa dado a comparação de nenhuma das funções moleculares apresentar um $p\text{-value}$ inferior a 0,05. Não obstante, é possível verificar que alguns destes valores reflectem aspectos já descritos, como a função molecular de *catalytic activity*. Esta encontra-se diminuída face ao estado de saúde, sendo constituída por *serine proteases*, a coagulação sanguínea dá-se por uma reacção em cadeia destas moléculas; seria, portanto, de esperar que esta função estivesse exacerbada em relação aos indivíduos saudáveis, mas por outro lado tem um $p\text{-value}$ de 0,99. Como corolário, a comparação efectuada ao nível da ontologia génica de funções moleculares demonstra a reduzida dimensão do oraloma da DMT1, sendo os resultados a este nível mais aleatórios do que representativos dos padrões desta patologia.

A mesma análise estatística efectuada para o oraloma da DMT2 regista 3 funções moleculares com $p\text{-values}$ inferiores a 0,05, nomeadamente

as funções moleculares de *antioxidant activity*, *catalytic activity* e *enzyme regulator activity*. A função de *antioxidant activity* é a que está mais aumentada face ao total de proteínas anotadas em indivíduos saudáveis, justificando-se este valor atendendo ao elevado stress oxidativo em casos de Diabetes Melitos tipo 2⁷².

Atendendo à patofisiologia da DMT2, que leva à ativação de vias enzimáticas alternativas e clivagem de moléculas que não a glicose para a obtenção de ATP's, é expectável que as funções moleculares de *catalytic activity* e *enzyme regulator activity* estejam exacerbadas face ao total de anotações do Oralome⁷.

4.2.2.3 Vias de Sinalização

A comparação estatística por diferença fraccional foi também efectuada para a ontologia de vias de sinalização. Devido aos dois tipos de Diabetes Melitos afectarem numerosas vias de sinalização, apenas foram representadas as que possuem um *p-value* inferior a 0,05 (Fig. 17).

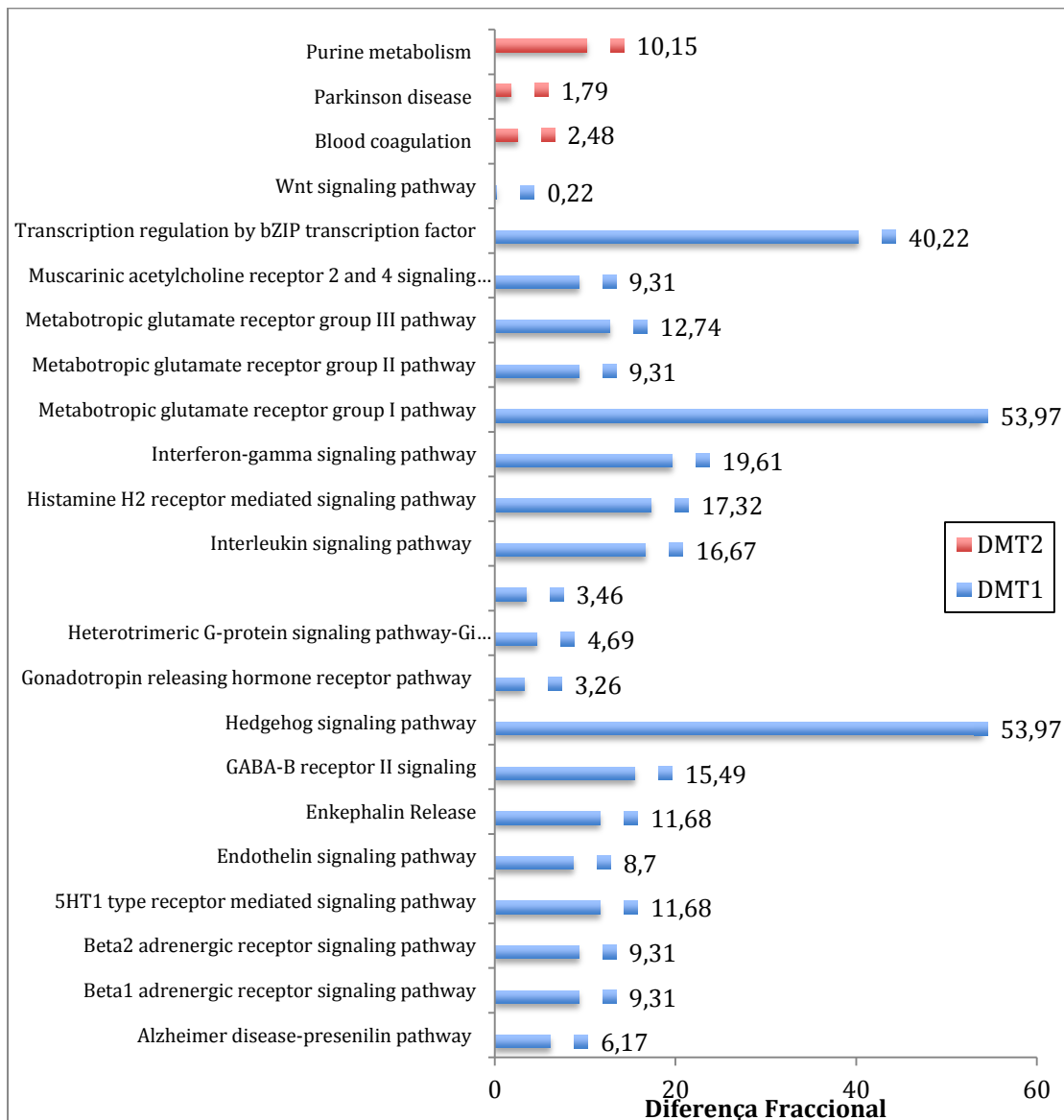


Figura 17 - Diferença fraccional entre os oralomas dos dois tipos de Diabetes Melitos e o de indivíduos saudáveis, quanto à ontologia de vias de sinalização (todos os valores apresentados possuem *p-value*<0,05)

O oroloma da DMT1 compreende 23 vias de sinalização e quando comparadas com o oroloma normal, 21 destas vias de sinalização apresentou um *p-value* inferior a 0,05, o que confere significância estatística a estas comparações. A via de sinalização mais aumentada é a *hedgehog signaling pathway* e a *Metabotropic glutamate receptor pathway*.

No caso do oroloma da DMT2, que engloba 65 vias de sinalização, a comparação com o oroloma normal apenas apresenta significância estatística relativamente a 3 vias de sinalização. Uma dessas vias de sinalização é a de *blood coagulation pathway* que se apresenta aumentada face aos indivíduos saudáveis, como de resto seria de esperar. As outras duas vias de sinalização com *p-value* inferior a 0,05 consistem nas vias de *parkinson disease* e *purine metabolism*.

4.2.3 Caracterização da Interatômica das proteínas alteradas no oraloma de pacientes diabéticos

A interatômica, área que estuda as interações entre biomoléculas, neste caso proteínas, pode ser estudada com recurso à ferramenta bioinformática STRING. Os mapas de interatômica gerados permitem visualizar de forma mais directa as relações proteicas do oraloma da Diabetes Melitos tipo 1 e 2.

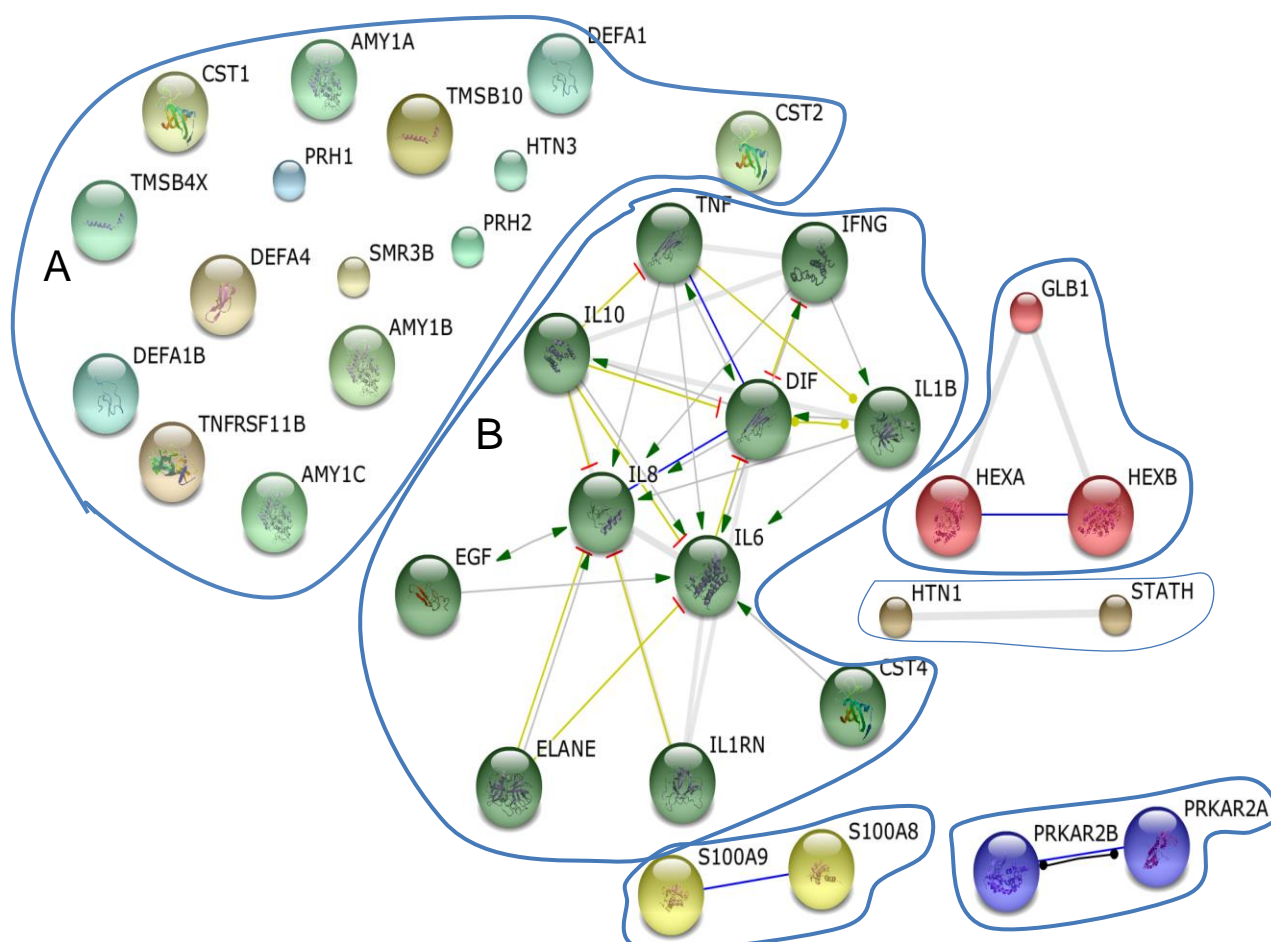


Figura 18 - Rede interatômica das proteínas orais alteradas em casos de Diabetes Melitos tipo 1 (rede gerada com recurso à ferramenta STRING; Clustering: MCL; Confidence > 0,7)

Na figura 18 está representada a rede interatômica das proteínas alteradas em casos de Diabetes Melitos tipo 1. No grupo A estão agrupadas as proteínas que não interagem com nenhuma outra ou o nível de confiança dessa interação encontra-se abaixo do valor estipulado como limite de

confiança: 0,7. Nos restantes grupos de proteínas encontram-se as proteínas que interagem com uma confiança superior a 0,7.

O grupo B representa as interacções entre as citocinas, um processo fundamental devido à DMT1 ser uma doença autoimune. É possível verificar que as interações representadas favorecem os processos inflamatórios.

Nos estudos que quantificaram as subunidades A e B da beta-hexosaminidase (HEXA e HEXB, respectivamente) verificou-se que a sua regulação era superior em indivíduos fumadores, o mesmo se constata em estudos de proteómica da urina excretada por pacientes diabéticos⁷³; esta alteração, tendo em conta a interatômica que demonstra a reação da beta-hexosaminidase e a beta-galactosidase (GLB1), pode inferir-se que existem efeitos na matriz extracelular provocados pela sobre-expressão desta proteína.

As proteínas *histatin-1* e *statherin* (HST1 e STATH, respectivamente) encontram-se ambas sub-reguladas. A primeira (*histatin-1*) é uma precursora da camada protectora proteica formada na superfície dentária e também exhibe propriedades anti-fúngicas e anti-bacterianas^{39,40}. Já a *statherin* estabiliza a saliva supersaturada com sais de cálcio, inibindo a sua precipitação. Esta proteína influencia também a formação dos cristais de hidroxiapatite na superfície dentária^{39,40}. Estudos comprovam que a Diabetes Melitos afecta negativamente a expressão de proteínas salivares como as apresentadas^{39,39,45}. Os níveis diminuídos de *statherin* podem mesmo estar relacionados com um aumento da prevalência de lesões da cavidade oral em pacientes diabéticos⁴⁰.

As proteínas S100A8/9 formam um complexo denominado *calprotectin* e são proteínas pro-inflamatórias que desempenham papéis importantes na quimiotaxia⁷⁴. Sendo uma doença autoimune, verifica-se que a regulação destas proteínas encontra-se aumentada no oraloma de pacientes com Diabetes Melitos tipo 1.

A via de sinalização da Proteína Cinase A (dependente de AMP cíclico) é referente à sinalização intracelular, promovendo os processos de gluconeogénese⁷⁵. É, então, expectável que esta via de sinalização esteja exacerbada face à falta de glicose intracelular para produção de energia (ATP) nos casos de Diabetes Melitos tipo 1. Isto é confirmado pelos dados

disponíveis que mostram que estas duas subunidades, (PRKAR2A/B) estão sobre-reguladas (regulação:1,3532) no oroloma deste tipo de Diabetes, contudo mais uma vez se conclui que seria preciso dispor de mais proteínas anotadas que participassem nesta via de sinalização para poder afirmar que a mesma se encontra alterada positivamente.

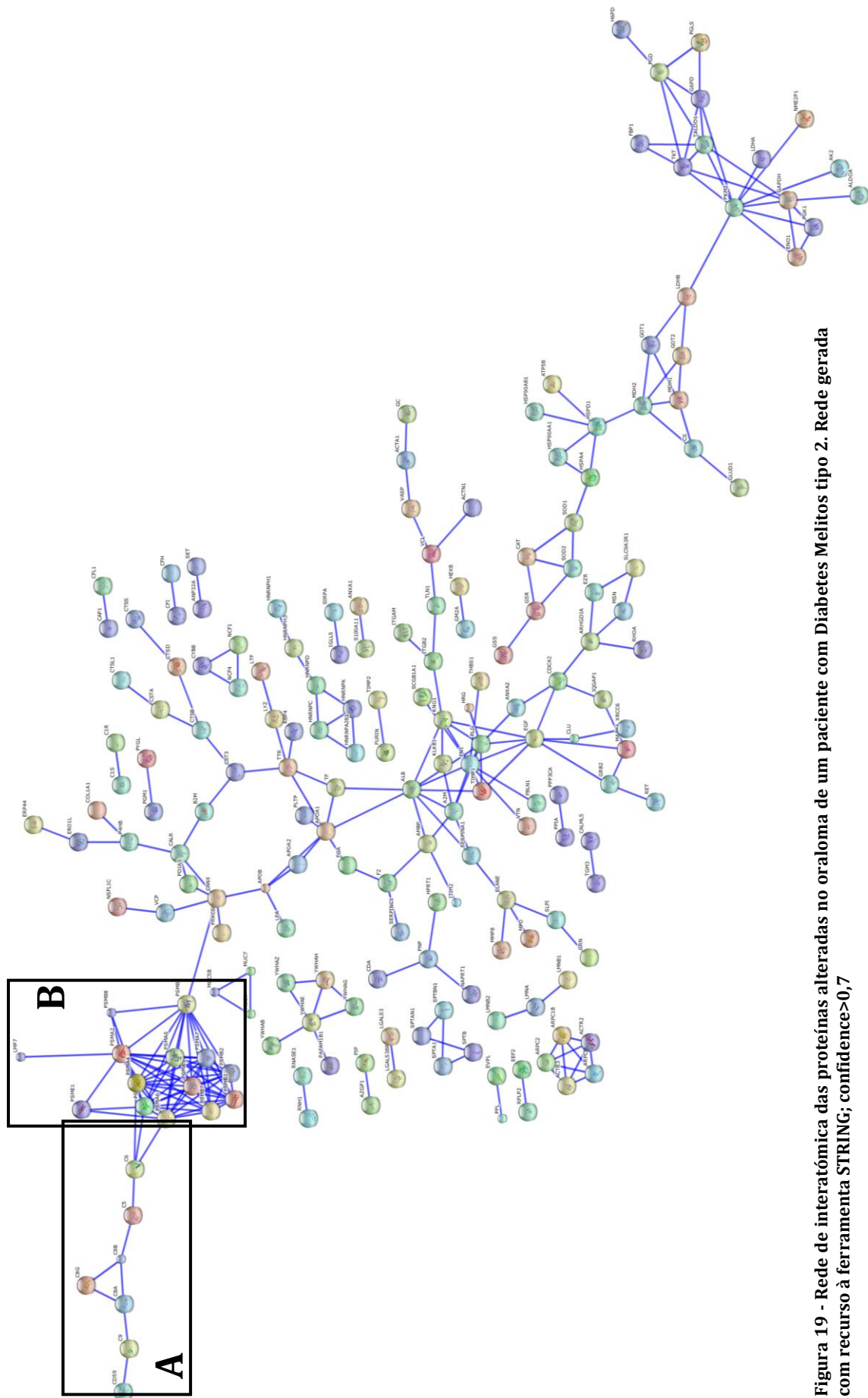


Figura 19 - Rede de interatômica das proteínas alteradas no oroloma de um paciente com Diabetes Melitus tipo 2. Rede gerada com recurso à ferramenta STRING; confiança>0,7

O oraloma da Diabetes Melitos tipo 2 é numeroso consistindo em 503 proteínas, o que tem como consequência uma rede interatômica bastante complexa (Figura 19).

Na figura 19-A estão patentes parte das proteínas do sistema complemento, envolvido na coagulação sanguínea. Já na figura 19-B é representado o proteassoma, um complexo proteico responsável por degradar proteínas sinalizadas como dispensáveis por ubiquitinas.

4.2.4 Comparação da microflora oral da Diabetes Melitos tipo 1 e 2

A cavidade oral é um ecossistema composto não só por tecidos e moléculas de origem humana como também pelas bactérias que nele se incluem, conseqüentemente existe uma reciprocidade de alterações no indivíduo e na microflora oral consoante as condições do meio, pH, temperatura, patologia do indivíduo, entre outros. Como corolário, a quantificação das diferentes espécies de microrganismos, pode ser característica de uma patologia que, alterando as condições orais do indivíduo, influi a prevalência e proliferação/diminuição de uma ou outra espécie microbiana.

Na Diabetes Melitos tipo 2 foram anotadas 146 entradas correspondentes a um total de 61 microrganismos dos domínios eucariota e bacteriano provenientes de 16 artigos científicos⁷⁶⁻⁹¹. Estes analisaram faixas etárias diferentes sendo que as idades estão compreendidas entre os 23 e os 88 anos, não havendo distinção quanto ao género dos indivíduos. 72 anotações correspondem a indivíduos não fumadores, 32 correspondem a fumadores e as restantes não possuem informações quanto aos hábitos sociais da população estudada.

Na Diabetes Melitos tipo 1 foram anotados 4 microrganismos a partir de 3 artigos científicos⁹²⁻⁹⁴ que não mencionavam hábitos sociais sendo que de todos nenhum utilizou indivíduos com mais de 18 anos.

Todos os microrganismos anotados na DMT1 estão também anotados na DMT2. Disto resulta que à luz da literatura actual apenas 4 espécies de microrganismos estão identificados como alterados na cavidade oral de ambos os tipos de Diabetes, nomeadamente: *A. Actinomyces comitans*, *Prevotella intermedia*, *Campylobacter* spp., *Candida* sp..

Tabela 2 - Microrganismos comuns anotados que foram quantificados na cavidade oral de pacientes com ambos os tipos de Diabetes. (*Constant site - Face mesio-vestibular do primeiro molar superior direito; Deepest site - local mais profundo à sondagem)

	Article ID	A. Actinomyces comitans	Prevotella Intermedia	Capnocytophaga spp.	Article ID	Candida sp.
Diabetes Melitos tipo 1	7562335	Constant site*			16190127	Mouth Rinse
		1,56	--	1,46		12,08
		Deepest site*				
		-5,6	0	1		
	9526910	Constant site*				
		-6,5	-1,02	1,48		
		Deepest site*				
		-4,9	-1,92	-1,35		
Diabetes Melitos tipo 2	17488443	Placa bacteriana supragengival			17488443	Saliva total
		-1,02	1,58			aumentada
		Placa bacteriana subgengival				
		1,07	1,43			
	15677809	Bolsas subgengivais				
		Alterações não significativas de acordo com o estudo				
	16579698	Bolsas subgengivais				
		-1,84	-1,09			
	18380556	Bolsas gengivais saudáveis				
		aumentada	aumentada	diminuída		
		Bolsas subgengivais com periodontite				
			aumentada	diminuída		

A comparação do microbiota oral dos dois tipos de Diabetes Melitos encara diversos vieses que acabam por impossibilitar a inferência de factos prováveis. Nem todos os estudos que quantificam as mesmas bactérias em ambos os tipos de Diabetes o fazem de forma absoluta (indicando um valor específico para a concentração de certa estirpe bacteriana), os locais anatómicos de recolha da amostra não são os mesmos e a população estudada na Diabetes Melitos tipo 2 tem mais idade e certos hábitos, como fumar que não se verificam na população (na sua maioria) adolescente estudada na Diabetes Melitos tipo 1.

Conhecer o proteoma dos microrganismos característicos dos dois tipos de Diabetes Melitos e a interacção de tais proteínas com as proteínas do hospedeiro pode clarificar aspectos importantes destas patologias, nomeadamente a sua etiologia e os seus efeitos na cavidade oral. O grupo de investigação do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Católica Portuguesa - Centro Regional das Beiras está no presente a desenvolver uma ferramenta que permitirá efectuar esta análise.

5 Conclusão

A primeira conclusão possível após elaboração deste estudo é a necessidade de mais estudos de proteómica oral em pacientes com Diabetes Melitos tipo 1. Esta patologia conta com um reduzido número de proteínas anotadas comparativamente à Diabetes Melitos tipo 2. Deste facto advém que as possíveis inferências a retirar de uma comparação entre os oralomas dos dois tipos de Diabetes Melitos estão limitados pela dimensão dos mesmos.

É igualmente necessário standardizar os métodos de colheita e análise em estudos de proteómica da cavidade oral, tendo em vista uma maior proporcionalidade entre os valores obtidos pelos diversos estudos, eliminando desta forma vieses.

Molecularmente, após a análise destas duas entidades patológicas, a Diabetes Melitos tipo 1 e tipo 2, conclui-se que tanto diferenças como semelhanças se refletem no conteúdo proteico da cavidade oral. A dificuldade em estabelecer diferenças moleculares entre os dois tipos de Diabetes Melitos prende-se com o facto de no caso da Diabetes Melitos tipo 2 esta só ser diagnosticada tardiamente quando as complicações decorrentes da Diabetes crónica estão já instaladas e os estudos de Diabetes Melitos tipo 1 estudarem indivíduos com uma média de idades inferior a 20 anos perto do *onset* da doença.

Uma das principais conclusões deste estudo é que existem duas fases na Diabetes Melitos tipo 2 que afectam os dados de proteómica gerados. Uma primeira fase em que se dá o *onset* da patologia e uma segunda fase em que os efeitos no oraloma se devem ao estado hiperglicémico crónico e à acumulação de AGE's, sendo esta segunda fase um elemento de semelhança em relação à Diabetes Melitos tipo 1.

Actualmente, à luz dos dados disponíveis, verifica-se que no oraloma da Diabetes Melitos tipo 1 são mais abundantes proteínas com funções imunológicas e de sinalização celular, ao passo que no oraloma da Diabetes Melitos tipo 2 verifica-se uma maior concentração de proteínas catalíticas.

Após este estudo comparativo é possível afirmar que a saliva reflecte, pelo menos, parcialmente as implicações sistémicas da patofisiologia da Diabetes Melitos tipo 1 e 2, como é reflectido pela comparação ao oraloma normal em que, por exemplo, os processos biológicos de *immune system process* se mostraram aumentados.

Entre as duas doenças, o cálculo de diferença fraccional mostrou sempre que os parâmetros ontológicos da DMT1 se encontram aumentados face aos da DMT2, o que pode ser atribuído à diferença de dimensão entre os dois oralomas.

O presente trabalho científico contribuiu para a actualização da base de dados do Oralome, interpretando a informação obtida com ferramentas bioinformáticas e cálculo de diferença fraccional. Culminou na constatação de que certas proteínas séricas caracteristicamente alteradas nos dois tipos de Diabetes Melitos estão também alteradas na saliva podendo esta ser utilizada como fluído de diagnóstico quando mais informação estiver disponível neste campo.

6 Bibliografia

1. World Health Organization. Diabetes Fact Sheet [Internet]. World Heal. Organ. 2013 [cited 2013 Feb 7]. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/index.html>
2. Chen L, Magliano DJ, Zimmet PZ. The worldwide epidemiology of type 2 diabetes mellitus[mdash]present and future perspectives. *Nat Rev Endocrinol*. 2012 Apr;8(4):228–36.
3. Shaw JE, Sicree RA, Zimmet PZ. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Res Clin Pr*. 2010;87:4–14.
4. S. Cotran; Ramzi, Kumar, Vinay, Collins, Tucker. Robbins Pathologic basis of disease. 6th Edition. Saunders; p. 914:925.
5. Reed, Stephen. Essential Physiological Biochemistry - An organ-based approach. 1st Edition. Wiley-Blackwell; 2009. p. 119:124.
6. Cnop M, Welsh N, Jonas J-C, Jörns A, Lenzen S, Eizirik DL. Mechanisms of Pancreatic β -Cell Death in Type 1 and Type 2 Diabetes: Many Differences, Few Similarities. *Diabetes*. 2005 Dec 1;54(suppl 2):S97–S107.
7. Forbes JM, Cooper ME. Mechanisms of Diabetic Complications. *Physiol Rev*. 2013 Jan 9;93(1):137–88.
8. Rang, H P, Dale, MM, Ritter, JM, Flower, R J. Rang and Dale's Pharmacology. 6th edition. Elsevier; 2007. p. 403:404.
9. Streckfus CF, Bigler LR. Saliva as a diagnostic fluid. *Oral Dis*. 2002;8(2):69–76.
10. Kaufman E, Lamster IB. THE DIAGNOSTIC APPLICATIONS OF SALIVA-- A REVIEW. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2002 Mar 1;13(2):197–212.
11. Jehmlich N, Dinh KHD, Gesell-Salazar M, Hammer E, Steil L, Dhople VM, et al. Quantitative analysis of the intra- and inter-subject variability of the whole salivary proteome. *J Periodontal Res*. 2013 Jun;48(3):392–403.
12. Thomas MV, Branscum A, Miller CS, Ebersole J, Al-Sabbagh M, Schuster JL. Within-subject variability in repeated measures of salivary analytes in healthy adults. *J Periodontol*. 2009 Jul;80(7):1146–53.
13. Rosa N, Correia MJ, Arrais JP, Lopes P, Melo J, Oliveira JL, et al. From the salivary proteome to the OralOme: Comprehensive molecular oral biology. *Arch Oral Biol*. 2012 Jul;57(7):853–64.

14. Das Neves Rosa NR. DO PROTEOMA SALIVAR AO ORALOMA [Internet]. Universidade Católica Portuguesa; 2011 [cited 2013 Jul 10]. Available from: http://www.researchgate.net/publication/232243203_Do_proteoma_salivar_ao_oraloma/file/d912f507c90480298b.pdf
15. Cabras T, Pisano E, Mastinu A, Denotti G, Pusceddu PP, Inzitari R, et al. Alterations of the salivary secretory peptidome profile in children affected by type 1 diabetes. *Mol Cell Proteomics*. 2010;9(10):2099–108.
16. Rao PV, Reddy AP, Lu X, Dasari S, Krishnaprasad A, Biggs E, et al. Proteomic Identification of Salivary Biomarkers of Type-2 Diabetes. *J Proteome Res*. 2009 Jan 2;8(1):239–45.
17. Costa PP, Trevisan GL, Macedo GO, Palioto DB, Souza SLS, Grisi MFM, et al. Salivary Interleukin-6, Matrix Metalloproteinase-8, and Osteoprotegerin in Patients With Periodontitis and Diabetes. *J Periodontol*. 2010 Mar;81(3):384–91.
18. Arrais JP, Rosa N, Melo J, Coelho ED, Amaral D, Correia MJ, et al. OralCard: A bioinformatic tool for the study of oral proteome. *Arch Oral Biol* [Internet]. 2013 Feb [cited 2013 Feb 20]; Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003996913000034>
19. Thomas PD. PANTHER: A Library of Protein Families and Subfamilies Indexed by Function. *Genome Res*. 2003 Sep 1;13(9):2129–41.
20. Franceschini A, Szklarczyk D, Frankild S, Kuhn M, Simonovic M, Roth A, et al. STRING v9.1: protein-protein interaction networks, with increased coverage and integration. *Nucleic Acids Res*. 2012 Nov 29;41(D1):D808–D815.
21. Fact SheetPubMed®: MEDLINE® Retrieval on the World Wide Web [Internet]. U.S. National Library of Medicine,; 2002. Available from: <http://www.nlm.nih.gov/pubs/factsheets/pubmed.html>
22. Belazi M, Galli-tsinopoulou, Assimina, Drakoulakos, Drakoulis, Fleva, Alexandra, Papanayiotou, Panayiotis. Salivary alterations in insulin-dependent diabetes mellitus. *Int J Paediatr Dent*. 1998;29–33.
23. Oxford GE, Tayari L, Barfoot MD, Peck AB, Tanaka Y, Humphreys-Beher MG. Salivary EGF levels reduced in diabetic patients. *J Diabetes Complications*. 2000;14(3):140–5.
24. Cutando A, Gómez-Moreno G, Villalba J, Ferrera MJ, Escames G, Acuña-Castroviejo D. Relationship between salivary melatonin levels and periodontal status in diabetic patients. *J Pineal Res*. 2003;35(4):239–44.
25. Astaneie F, Afshari M, Mojtahedi A, Mostafalou S, Zamani MJ, Larijani B, et al. Total antioxidant capacity and levels of epidermal growth factor and nitric oxide in blood and saliva of insulin-dependent diabetic patients. *Arch Med Res*. 2005;36(4):376–81.

26. Knas M, Karaszewska K, Szajda S, Zarzycki W, Dudzik D, Zwierz K. Saliva of patients with Type 1 diabetes: effect of smoking on activity of lysosomal exoglycosidases. *Oral Dis.* 2006 May;12(3):278–82.
27. Duarte P, Neto J, Casati M, Sallum E, Nociti F. Diabetes modulates gene expression in the gingival tissues of patients with chronic periodontitis. *Oral Dis.* 2007 Nov;13(6):594–9.
28. Hirai H, Miura J, Hu Y, Larsson H, Larsson K, Lernmark A, et al. Selective screening of secretory vesicle-associated proteins for autoantigens in type 1 diabetes: VAMP2 and NPY are new minor autoantigens. *Clin Immunol.* 2008 Jun;127(3):366–74.
29. Javed F, Sundin U, Altamash M, Klinge B, Engström P-E. Self-perceived oral health and salivary proteins in children with type 1 diabetes. *J Oral Rehabil.* 2009 Jan;36(1):39–44.
30. Piras M, Hand AR, Mednieks MI, Piludu M. Amylase and cyclic amp receptor protein expression in human diabetic parotid glands. *J Oral Pathol Med.* 2010 Apr 29;39(9):715–21.
31. Su H, Velly AM, Salah MH, Benarroch M, Trifiro M, Schipper HM, et al. Altered redox homeostasis in human diabetes saliva. *J Oral Pathol Med.* 2012 Mar;41(3):235–41.
32. Alpagot T, Silverman S, Lundergan W, Bell C, Chambers DW. Crevicular fluid elastase levels in relation to periodontitis and metabolic control of diabetes. *J Periodontal Res.* 2002;36(3):169–74.
33. Caseiro A, Vitorino R, Barros AS, Ferreira R, Calheiros-Lobo MJ, Carvalho D, et al. Salivary peptidome in type 1 diabetes mellitus. *Biomed Chromatogr.* 2012 May;26(5):571–82.
34. Busato IMS, Ignácio SA, Brancher JA, Moysés ST, Azevedo-Alanis LR. Impact of clinical status and salivary conditions on xerostomia and oral health-related quality of life of adolescents with type 1 diabetes mellitus. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2012 Feb;40(1):62–9.
35. Aydin S. A comparison of Ghrelin, Glucose, Alpha-amylase and Protein Levels in Saliva from Diabetics. *J Biochem Mol Biol.* 2007th ed. 29–35.
36. Bachrach G, Muster Z, Raz I, Chaushu G, Stabholz A, Nussbaum G, et al. Assessing the levels of immunoglobulins in the saliva of diabetic individuals with periodontitis using checkerboard immunodetection. *Oral Dis.* 2007 Dec 18;14(1):51–9.
37. Soell M, Feki A, Hannig M, Sano H, Pinget M, Selimovic D. Chromogranin A detection in saliva of type 2 diabetes patients. *Bosn J Basic Med Sci.* 2010;10:2–8.

38. Yuan J, Dunn P, Martinus RD. Detection of Hsp60 in saliva and serum from type 2 diabetic and non-diabetic control subjects. *Cell Stress Chaperones*. 2011 Jul 13;16(6):689–93.
39. Isola M, Lantini M, Solinas P, Diana M, Isola R, Loy F, et al. Diabetes affects statherin expression in human labial glands. *Oral Dis*. 2011 Oct;17(7):685–9.
40. Isola M, Cossu M, Diana M, Isola R, Loy F, Solinas P, et al. Diabetes reduces statherin in human parotid: immunogold study and comparison with submandibular gland. *Oral Dis*. 2012 May;18(4):360–4.
41. Dodds MWJ, Dodds AP. Effects of glycemic control on saliva flow rates and protein composition in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. April 1997. 465–460.
42. Gomes MAB, Rodrigues FH, Afonso-Cardoso SR, Buso AM, Silva AG, Favoreto S, et al. Levels of immunoglobulin A1 and messenger RNA for interferon gamma and tumor necrosis factor alpha in total saliva from patients with diabetes mellitus type 2 with chronic periodontal disease. *J Periodontal Res*. 2006 Jun;41(3):177–83.
43. Yin J, Gao H, Yang J, Xu L, Li M. Measurement of Salivary Resistin Level in Patients with Type 2 Diabetes. *Int J Endocrinol*. 2012;2012:1–5.
44. Khan AR, Awan FR. Mining of protein based biomarkers for type 2 Diabetes Mellitus. *Pak J Pharm Sci*. 2012;889–901.
45. Isola M, Solinas P, Proto E, Cossu M, Lantini M. Reduced statherin reactivity of human submandibular gland in diabetes. *Oral Dis*. 2011 Mar;17(2):217–20.
46. Dodds MW, Yeh C-K, Johnson DA. Salivary alterations in type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus and hypertension. *Community Dent Oral Epidemiol*. 2000;28(5):373–81.
47. Collin H-L, Sorsa T, Meurman JH, Niskanen L, Salo T, Rönkä H, et al. Salivary matrix metalloproteinase (MMP-8) levels and gelatinase (MMP-9) activities in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Periodontal Res*. 2000;35(5):259–65.
48. Bassim CW, Redman RS, DeNucci DJ, Becker KL, Nylén ES. Salivary Procalcitonin and Periodontitis in Diabetes. *J Dent Res*. 2008 Jul 1;87(7):630–4.
49. Chan HH, Rahim ZHA, Jessie K, Hashim OH, Taiyeb-Ali TB. Salivary Proteins Associated with Periodontitis in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. *Int J Mol Sci*. 2012 Apr 12;13(12):4642–54.
50. The UniProt Consortium. Update on activities at the Universal Protein Resource (UniProt) in 2013. *Nucleic Acids Res*. 2012 Nov 17;41(D1):D43–D47.

51. Mi H, Muruganujan A, Thomas PD. PANTHER in 2013: modeling the evolution of gene function, and other gene attributes, in the context of phylogenetic trees. *Nucleic Acids Res.* 2012 Nov 27;41(D1):D377–D386.
52. Jensen LJ, Kuhn M, Stark M, Chaffron S, Creevey C, Muller J, et al. STRING 8--a global view on proteins and their functional interactions in 630 organisms. *Nucleic Acids Res.* 2009 Jan 1;37(Database):D412–D416.
53. Mering C v. STRING: a database of predicted functional associations between proteins. *Nucleic Acids Res.* 2003 Jan 1;31(1):258–61.
54. Von Mering C, Jensen LJ, Kuhn M, Chaffron S, Doerks T, Kruger B, et al. STRING 7--recent developments in the integration and prediction of protein interactions. *Nucleic Acids Res.* 2007 Jan 3;35(Database):D358–D362.
55. Border MB, Schwartz S, Carlson J, Dibble CF, Kohltfarber H, Offenbacher S, et al. Exploring salivary proteomes in edentulous patients with type 2 diabetes. *Mol Biosyst.* 2012;8(4):1304.
56. Kim EK, Choi E-J. Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. *Biochim Biophys Acta Bba - Mol Basis Dis.* 2010 Apr;1802(4):396–405.
57. Davis RJ. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell.* 2000 Oct 13;103(2):239–52.
58. Wang X, Shaw S, Amiri F, Eaton DC, Marrero MB. Inhibition of the Jak/STAT signaling pathway prevents the high glucose-induced increase in tgf-beta and fibronectin synthesis in mesangial cells. *Diabetes.* 2002 Dec;51(12):3505–9.
59. Ramana CV, Gil MP, Schreiber RD, Stark GR. Stat1-dependent and -independent pathways in IFN-gamma-dependent signaling. *Trends Immunol.* 2002 Feb;23(2):96–101.
60. Mathis D, Vence L, Benoist C. [beta]-Cell death during progression to diabetes. *Nature.* 2001 Dec 13;414(6865):792–8.
61. Welters HJ, Kulkarni RN. Wnt signaling: relevance to beta-cell biology and diabetes. *Trends Endocrinol Metab Tem.* 2008 Dec;19(10):349–55.
62. Jin T. The WNT signalling pathway and diabetes mellitus. *Diabetologia.* 2008 Oct 1;51(10):1771–80.
63. Logan CY, Nusse R. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2004;20:781–810.
64. Rulifson IC, Karnik SK, Heiser PW, ten Berge D, Chen H, Gu X, et al. Wnt signaling regulates pancreatic β cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci.* 2007 Apr 10;104(15):6247–52.

65. Schoenborn JR, Wilson CB. Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses. *Adv Immunol.* 2007;96:41–101.
66. Zhang J. Paradoxical roles of interferon-gamma in autoimmune disease. *Expert Rev Clin Immunol.* 2007 Jan;3(1):35–8.
67. Rotter V, Nagaev I, Smith U. Interleukin-6 (IL-6) Induces Insulin Resistance in 3T3-L1 Adipocytes and Is, Like IL-8 and Tumor Necrosis Factor- α , Overexpressed in Human Fat Cells from Insulin-resistant Subjects. *J Biol Chem.* 2003 Nov 14;278(46):45777–84.
68. Wędrychowicz A, Dziatkowiak H, Sztefko K, Wędrychowicz A. Interleukin-6 (IL-6) and IGF-IGFBP System in Children and Adolescents with Type 1 Diabetes Mellitus. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2004;435–9.
69. Dogan Y, Akarsu S, Ustundag B, Yilmaz E, Gurgoze M. Serum IL-1beta, IL-2, and IL-6 in insulin-dependent diabetic children. *Mediators Inflamm.* 2006;
70. P. R. Galasseti , K. Iwanaga , A. M. Pontello , F. P. Zaldivar , R. L. Flores , J. K. Larson. Effect of prior hyperglycemia on IL-6 responses to exercise in children with type 1 diabetes. *Am J Physiol - Endocrinol Metab.* 2006;833–9.
71. Małgorzata Myśliwieca, Corresponding author contact information, E-mail the corresponding author,, Anna Balcerskaa,, Katarzyna Zorenab,, Jolanta Myśliwskab,, Paweł Lipowskic,, Krystyna Raczyńskac. The role of vascular endothelial growth factor, tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 in pathogenesis of diabetic retinopathy. *Diabetes Res Clin Pract.* 2006;141–6.
72. Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, Grodsky GM. Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. *Endocr Rev.* 2002;599–622.
73. Hultberg B, Isaksson A, Brattström L, Israelsson B. Elevated urinary excretion of beta-hexosaminidase in smokers. *Eur J Clin Chem Clin Biochem J Forum Eur Clin Chem Soc.* 1992 Mar;30(3):131–3.
74. Ryckman C, Vandal K, Rouleau P, Talbot M, Tessier PA. Proinflammatory activities of S100: proteins S100A8, S100A9, and S100A8/A9 induce neutrophil chemotaxis and adhesion. *J Immunol.* 2003 Mar;3233–42.
75. Cao W, Collins QF, Becker TC, Robidoux J, Lupo EG, Xiong Y, et al. p38 Mitogen-activated Protein Kinase Plays a Stimulatory Role in Hepatic Gluconeogenesis. *J Biol Chem.* 2005 Dec 30;280(52):42731–7.
76. Sardi JCO, Duque C, Mariano FS, Marques MR, Höfling JF, Gonçalves RB. Adhesion and invasion of *Candida albicans* from periodontal pockets of patients with chronic periodontitis and diabetes to gingival human fibroblasts. *Med Mycol.* 2012 Jan;50(1):43–9.
77. Sanitá PV, Pavarina AC, Giampaolo ET, Silva MM, Mima EG de O, Ribeiro DG, et al. *Candida* spp. prevalence in well controlled type 2 diabetic patients

- with denture stomatitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology*. 2011 Jun;111(6):726–33.
78. Dorocka-Bobkowska B, Zozulinska-Ziolkiewicz D, Wierusz-Wysocka B, Hedzelek W, Szumala-Kakol A, Budtz-Jørgensen E. Candida-associated denture stomatitis in type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract*. 2010 Oct;90(1):81–6.
 79. Ohlrich EJ, Cullinan MP, Leichter JW. Diabetes, periodontitis, and the subgingival microbiota. *J Oral Microbiol* [Internet]. 2010 Dec 21 [cited 2013 Aug 29];2(0). Available from: <http://www.journaloforalmicrobiology.net/index.php/jom/article/view/5818>
 80. Sardi JCO, Duque C, Höfling JF, Gonçalves RB. Genetic and phenotypic evaluation of *Candida albicans* strains isolated from subgingival biofilm of diabetic patients with chronic periodontitis. *Med Mycol*. 2012 Jul;50(5):467–75.
 81. Sardi JCO, Duque C, Camargo GACG, Hofling JF, Gonçalves RB. Periodontal conditions and prevalence of putative periodontopathogens and *Candida* spp. in insulin-dependent type 2 diabetic and non-diabetic patients with chronic periodontitis—A pilot study. *Arch Oral Biol*. 2011 Oct;56(10):1098–105.
 82. Javed F, Klingspor L, Sundin U, Altamash M, Klinge B, Engström P-E. Periodontal conditions, oral *Candida albicans* and salivary proteins in type 2 diabetic subjects with emphasis on gender. *Bmc Oral Heal*. 2009;9(1):12.
 83. Tsang CSP, Chu FCS, Leung WK, Jin LJ, Samaranyake LP, Siu SC. Phospholipase, proteinase and haemolytic activities of *Candida albicans* isolated from oral cavities of patients with type 2 diabetes mellitus. *J Med Microbiol*. 2007 Oct 1;56(10):1393–8.
 84. Bremenkamp RM, Caris AR, Jorge AOC, Back-Brito GN, Mota AJ, Balducci I, et al. Prevalence and antifungal resistance profile of *Candida* spp. oral isolates from patients with type 1 and 2 diabetes mellitus. *Arch Oral Biol*. 2011 Jun;56(6):549–55.
 85. Melton JJ, Redding SW, Kirkpatrick WR, Reasner CA, Ocampo GL, Venkatesh A, et al. Recovery of *Candida dubliniensis* and other *Candida* species from the oral cavity of subjects with periodontitis who had well-controlled and poorly controlled type 2 diabetes: a pilot study. *Spec Care Dentist*. 2010 Nov;30(6):230–4.
 86. Makiura N, Ojima M, Kou Y, Furuta N, Okahashi N, Shizukuishi S, et al. Relationship of *Porphyromonas gingivalis* with glycemic level in patients with type 2 diabetes following periodontal treatment. *Oral Microbiol Immunol*. 2008;23(4):348–51.

87. Sashikumar R, Kannan R. Salivary glucose levels and oral candidal carriage in type II diabetics. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology*. 2010 May;109(5):706–11.
88. Hintao J, Teanpaisan R, Chongsuvivatwong V, Ratarasan C, Dahlén G. The microbiological profiles of saliva, supragingival and subgingival plaque and dental caries in adults with and without type 2 diabetes mellitus. *Oral Microbiol Immunol*. 2007;22(3):175–81.
89. Shillitoe E, Weinstock R, Kim T, Simon H, Planer J, Noonan S, et al. The oral microflora in obesity and type-2 diabetes. *J Oral Microbiol* [Internet]. 2012 Oct 30 [cited 2013 Aug 29];4(0). Available from: <http://www.journaloforalmicrobiology.net/index.php/jom/article/view/19013>
90. Khovidhunkit SP, Suwantuntula T, Thaweboon S, Mitrirattanakul S, Chomkhakhai U, Khovidhunkit W. Xerostomia, hyposalivation, and oral microbiota in type 2 diabetic patients: a preliminary study. *Med J Med Assoc Thai*. 2009;92(9):1220.
91. MIKI OJIMA, DDS, PHD, MUNEHIRO TAKEDA, DDS, HIDEO YOSHIOKA, DDS, PHD, MAKOTO NOMURA, MD, PHD, NORIAKI TANAKA, DDS, PHD, TAKAHIRO KATO, DDS, PHD, et al. Relationship of Periodontal Bacterium Genotypic Variations With Periodontitis in Type 2 Diabetic Patients. *Diabetes Care*. 28th ed. 2005 Feb;
92. Sbordone L, Ramaglia L, Barone A, Ciaglia RN, Tenore A, Iacono VJ. Periodontal status and selected cultivable anaerobic microflora of insulin-dependent juvenile diabetics. *J Periodontol*. 1995 Jun;66(6):452–61.
93. Sbordone L, Ramaglia L, Barone A, Ciaglia RN, Iacono VJ. Periodontal status and subgingival microbiota of insulin-dependent juvenile diabetics: a 3-year longitudinal study. *J Periodontol*. 1998 Feb;69(2):120–8.
94. Kumar BV, Padshetty NS, Bai KY, Rao MS. Prevalence of *Candida* in the oral cavity of diabetic subjects. *J Assoc Physicians India*. 2005 Jul;53:599–602.

7 Anexos

7.1 Anexo 1 - Tabela do oraloma da DMT1

7.2 Anexo 2 - Tabela do oraloma da DMT2

7.3 Anexo 3 - Comparação DMT1-DMT2

Biological Process	DMT2	DMT1 esperado	DMT1 observado	Diferença fracional	P value
cell communication	85	1,031	13	11,61	0,002462245
cellular process	118	1,431	13	8,08	0,040874835
apoptosis	22	0,267	5	17,74	0,016482194
reproduction	12	0,146	1	5,87	0,569442458
developmental process	52	0,631	3	3,76	0,715785571
metabolic process	221	2,680	11	3,10	0,96307574
cell cycle	33	0,400	3	6,50	0,402741419
immune system process	105	1,274	11	7,64	0,086762533
cell adhesion	37	0,449	1	1,23	0,931509418
response to stimulus	72	0,873	8	8,16	0,111240069
Total Oraloma normal	419				
Total Diabetes 1	29				

Função Molecular	DMT2	DMT1 esperado	DMT1 observado	Diferença fracional	p-value
binding	146	1,770807194	15	7,47	0,045866893
catalytic activity	182	2,207444584	3	0,36	0,999982504
enzyme regulator activity	46	0,557925554	5	7,96	0,207615796
receptor activity	35	0,424508574	3	6,07	0,440893433

Pathway	DMT2	DMT1 esperado	DMT1 observado	Diferença fracional	
Alzheimer disease-presenilin pathway			4	0,05	2 40,22 0,03
Apoptosis signaling pathway			3	0,04	1 26,48 0,19
Endothelin signaling pathway			2	0,02	2 81,45 0,01
Gonadotropin releasing hormone receptor pathway			6	0,07	3 40,22 0,01
Heterotrimeric G-protein signaling pathway-Gi alpha and Gs alpha mediated pathway			3	0,04	2 53,97 0,02
Inflammation mediated by chemokine and cytokine signaling pathway			12	0,15	4 26,48 0,01
Interleukin signaling pathway			2	0,02	3 122,67 0,00
Interferon-gamma signaling pathway			1	0,01	1 81,45 0,07
Wnt signaling pathway			2	0,02	1 40,22 0,13

7.4 Anexo 4 - DMT1 comparado ao OralOma normal

Biological Process	Oraloma Normal	Diabetes esperado	Diabetes observado	Diferença fracional	P value
cell communication	544	6,598	13	0,97	0,007013492
cellular process	912	11,061	13	0,18	0,287905016
apoptosis	142	1,722	5	1,90	0,026555207
reproduction	109	1,322	1	-0,24	0,741568258
developmental process	469	5,688	3	-0,47	0,942642667
metabolic process	1307	15,852	11	-0,31	0,977046763
cell cycle	269	3,263	3	-0,08	0,648398234
immune system process	459	5,567	11	0,98	0,01466063
cell adhesion	219	2,656	1	-0,62	0,938322452
Total Oraloma normal	2391				
Total Diabetes 1	29				

Função Molecular	Oraloma Normal	Diabetes esperado	Diabetes observado	Diferença fracional	
binding	965	11,70	15	0,28	0,15
catalytic activity	946	11,47	3	-0,74	1,00
enzyme regulator activity	202	2,45	5	1,04	0,09
receptor activity	188	2,28	3	0,32	0,40

Pathway	Oraloma Normal	Diabetes esperado	Diabetes observado	Diferença fracional	
Alzheimer disease-presenilin pathway	23	0,28	2	6,17	0,03
Apoptosis signaling pathway	23	0,28	1	2,58	0,24
Beta1 adrenergic receptor signaling pathway	16	0,19	2	9,31	0,02
Beta2 adrenergic receptor signaling pathway	16	0,19	2	9,31	0,02
5HT1 type receptor mediated signaling pathway	13	0,16	2	11,68	0,01
Endothelin signaling pathway	17	0,21	2	8,70	0,02
Enkephalin Release	13	0,16	2	11,68	0,01
GABA-B receptor II signaling	10	0,12	2	15,49	0,01
Hedgehog signaling pathway	3	0,04	2	53,97	0,00
Gonadotropin releasing hormone receptor pathway	58	0,70	3	3,26	0,03
Heterotrimeric G-protein signaling pathway-Gi alpha and Gs alpha mediated pathway	29	0,35	2	4,69	0,05
Inflammation mediated by chemokine and cytokine signaling pathway	74	0,90	4	3,46	0,01
Interleukin signaling pathway	14	0,17	3	16,67	0,00
Histamine H2 receptor mediated signaling pathway	9	0,11	2	17,32	0,01
Interferon-gamma signaling pathway	4	0,05	1	19,61	0,05
Metabotropic glutamate receptor group I pathway	3	0,04	2	53,97	0,00
Metabotropic glutamate receptor group II pathway	16	0,19	2	9,31	0,02
Metabotropic glutamate receptor group III pathway	12	0,15	2	12,74	0,01

Muscarinic acetylcholine receptor 2 and 4 signaling pathway	16	0,19	2	9,31	0,02
Transcription regulation by bZIP transcription factor	4	0,05	2	40,22	0,00
Wnt signaling pathway	43	0,52	1	0,92	0,41

7.5 Anexo 5 - DMT2 comparada ao oraloma normal

Biological Process	Oraloma Normal	Diabetes esperado	Diabetes observado	Diferença fracional	P value
apoptosis	127	22,780	24	0,05	0,43
cell adhesion	194	34,797	48	0,38	0,02
cell communication	503	90,221	101	0,12	0,11
cell cycle	237	42,510	39	-0,08	0,74
cellular component organization	304	54,527	37	-0,32	1,00
cellular process	843	151,206	141	-0,07	0,86
developmental process	411	73,720	64	-0,13	0,91
generation of precursor metabolites and energy	89	15,964	14	-0,12	0,73
homeostatic process	30	5,381	5	-0,07	0,63
immune system process	398	71,388	120	0,68	0,00
localization	27	4,843	4	-0,17	0,71
metabolic process	1261	226,181	250	0,11	0,01
reproduction	68	12,197	14	0,15	0,34
response to stimulus	286	51,299	84	0,64	0,00
system process	281	50,402	49	-0,03	0,61
transport	459	82,329	68	-0,17	0,97
Total Oraloma normal	2336				
Total Diabetes	419				

Função Molecular	Oraloma Normal	Diabetes esperado	Diabetes observado	Diferença fracional	P value
antioxidant activity	16	2,87	8	1,79	0,01
binding	910	163,22	146	-0,11	0,96
catalytic activity	909	163,04	182	0,12	0,03
enzyme regulator activity	181	32,47	46	0,42	0,01
ion channel activity	27	4,84	3	-0,38	0,86
motor activity	30	5,38	2	-0,63	0,97
receptor activity	167	29,95	35	0,17	0,19
structural molecule activity	426	76,41	58	-0,24	0,99
transcription regulator activity	86	15,43	3	-0,81	1,00
translation regulator activity	45	8,07	4	-0,50	0,96
transporter activity	149	26,73	26	-0,03	0,59
Total Oraloma normal	2336				
Total Diabetes	419				

Pathway	Oraloma Normal	Diabetes esperado	Diabetes observado	Diferença fracional	P value
5-Hydroxytryptamine degradation	10	1,79	1,00	-0,44	0,83
Adenine and hypoxanthine salvage pathway	3	0,54	2,00	2,72	0,10
Alzheimer disease-amyloid secretase pathway	9	1,61	2,00	0,24	0,48
Alzheimer disease-presenilin pathway	22	3,95	4,00	0,01	0,56
Angiogenesis	28	5,02	3,00	-0,40	0,88
Angiotensin II-stimulated signaling through G proteins and beta-arrestin	15	2,69	3,00	0,12	0,50
Apoptosis signaling pathway	25	4,48	3,00	-0,33	0,83
Asparagine and aspartate biosynthesis	2	0,36	2,00	4,58	0,05
ATP synthesis	5	0,90	1,00	0,12	0,59
Axon guidance mediated by netrin	7	1,26	2,00	0,59	0,36
Axon guidance mediated by semaphorins	8	1,43	1,00	-0,30	0,76
Axon guidance mediated by Slit/Robo	8	1,43	1,00	-0,30	0,76
B cell activation	16	2,87	3,00	0,05	0,55
Blood coagulation	16	2,87	10,00	2,48	0,00
Cadherin signaling pathway	19	3,41	2,00	-0,41	0,86
Cytoskeletal regulation by Rho GTPase	50	8,97	7,00	-0,22	0,79
De novo purine biosynthesis	12	2,15	1,00	-0,54	0,88
Dopamine receptor mediated signaling pathway	25	4,48	1,00	-0,78	0,99
EGF receptor signaling pathway	35	6,28	8,00	0,27	0,29
Endothelin signaling pathway	16	2,87	2,00	-0,30	0,78
FAS signaling pathway	9	1,61	3,00	0,86	0,22
FGF signaling pathway	31	5,56	9,00	0,62	0,11
Fructose galactose metabolism	4	0,72	1,00	0,39	0,51
Glutamine glutamate conversion	3	0,54	1,00	0,86	0,42
Glycolysis	17	3,05	5,00	0,64	0,19
Gonadotropin releasing hormone receptor pathway	55	9,87	6,00	-0,39	0,93
Heterotrimeric G-protein signaling pathway-Gi alpha and Gs alpha mediated pathway	27	4,84	3,00	-0,38	0,86
Heterotrimeric G-protein signaling pathway-Gq alpha and Go alpha mediated pathway	21	3,77	2,00	-0,47	0,89
Heterotrimeric G-protein signaling pathway-rod outer segment phototransduction	10	1,79	1,00	-0,44	0,83
Huntington disease	59	10,58	9,00	-0,15	0,73
Inflammation mediated by chemokine and cytokine signaling pathway	74	13,27	12,00	-0,10	0,68
Insulin/IGF pathway-mitogen activated protein kinase kinase/MAP kinase cascade	9	1,61	1,00	-0,38	0,80
Integrin signalling pathway	84	15,07	16,00	0,06	0,44
Interferon-gamma signaling pathway	3	0,54	1,00	0,86	0,42
Interleukin signaling pathway	13	2,33	2,00	-0,14	0,68
N-acetylglucosamine metabolism	2	0,36	1,00	1,79	0,30
Nicotine pharmacodynamics pathway	14	2,51	1,00	-0,60	0,92
Nicotinic acetylcholine receptor signaling pathway	36	6,46	1,00	-0,85	1,00
p38 MAPK pathway	9	1,61	2,00	0,24	0,48
p53 pathway	15	2,69	1,00	-0,63	0,93
Parkinson disease	36	6,46	18,00	1,79	0,00
PDGF signaling pathway	18	3,23	1,00	-0,69	0,96
Pentose phosphate pathway	5	0,90	2,00	1,23	0,23
Phenylalanine biosynthesis	2	0,36	2,00	4,58	0,05
PI3 kinase pathway	14	2,51	1,00	-0,60	0,92
Plasminogen activating cascade	8	1,43	4,00	1,79	0,06
Purine metabolism	1	0,18	2,00	10,15	0,01

Pyridoxal phosphate salvage pathway	1	0,18	1,00	4,58	0,16
Pyrimidine Metabolism	6	1,08	1,00	-0,07	0,66
Pyruvate metabolism	7	1,26	3,00	1,39	0,13
Ras Pathway	20	3,59	3,00	-0,16	0,70
Salvage pyrimidine deoxyribonucleotides	2	0,36	1,00	1,79	0,30
Salvage pyrimidine ribonucleotides	6	1,08	2,00	0,86	0,29
Synaptic vesicle trafficking	8	1,43	1,00	-0,30	0,76
T cell activation	20	3,59	5,00	0,39	0,29
TCA cycle	6	1,08	2,00	0,86	0,29
TGF-beta signaling pathway	9	1,61	2,00	0,24	0,48
Toll receptor signaling pathway	10	1,79	3,00	0,67	0,27
Tyrosine biosynthesis	2	0,36	2,00	4,58	0,05
Ubiquitin proteasome pathway	24	4,30	4,00	-0,07	0,62
Vasopressin synthesis	5	0,90	2,00	1,23	0,23
VEGF signaling pathway	12	2,15	2,00	-0,07	0,63
Vitamin B6 metabolism	1	0,18	1,00	4,58	0,16
Wnt signaling pathway	41	7,35	2,00	-0,73	0,99
Xanthine and guanine salvage pathway	2	0,36	2,00	4,58	0,05

Total Oraloma normal	2336
Total Diabetes	419

UniProtKBAC	Name	Parotid	Whole Saliva	Crevicular Fluid	Mucosa	Health	Disease (MeSH ID)	Regulation	Age group	Gender*	Social Habits*	Methods of Sampling**	Methods of Analysis***	Type of Study
F6KPG5	Albumin		x			x	68003922	-0,3	4-17	MF	otherwise healthy children, healthy children in the control group		Protein-dye binding	Cross-sectional
O00300	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 11B (Osteoclastogenesis inhibitory factor) (Osteoprotegerin)				x	x	68003922	-1,6		MF	non-smokers. healthy individuals with no medication which could influence periodontitis except for diabetes type 1 medication, not pregnant womenwithout using any contraceptive treatment or lactant. All non-smoking individuals	gingival tissue samples	RNA extraction and measured by biophotometer	Proteomics
P01036	Cystatin-S (Cystatin-4) (Cystatin-SA-III) (Salivary acidic protein 1)		x			x	68003922		Children					
P01037	Cystatin-SN (Cystatin-SA-I) (Cystatin-1) (Salivary cystatin-SA-1)		x			x	68003922		Children					
P01133	Pro-epidermal growth factor (EGF) (Cleaved into: Epidermal growth factor (Urogastrone))		x			x	68003922	-0,3	48,7	MF	periodontally healthy, excluded: patients under pharmacological treatment, hormonal contraception, pregnants.		Quantikine Human EGF Immunoassay	
P01375	Tumor necrosis factor				x	x	68003922	-0,4		MF	non-smokers. healthy individuals with no medication which could influence periodontitis except for diabetes type 1 medication, not pregnant womenwithout using any contraceptive treatment or lactant. All non-smoking individuals	gingival tissue samples	RNA extraction and measured by biophotometer	Proteomics
P01579	Interferon gamma				x	x	68003922	2,3		MF	non-smokers. healthy individuals with no medication which could influence periodontitis except for diabetes type 1 medication, not pregnant womenwithout using any contraceptive treatment or lactant. All non-smoking individuals	gingival tissue samples	RNA extraction and measured by biophotometer	Proteomics
P01584	Interleukin-1 beta (IL-1 beta) (Catabolin)				x	x	68003922	5		MF	non-smokers. healthy individuals with no medication which could influence periodontitis except for diabetes type 1 medication, not pregnant womenwithout using any contraceptive treatment or lactant. All non-smoking individuals	gingival tissue samples	RNA extraction and measured by biophotometer	Proteomics
P01876	Ig alpha-1 chain C region		x			x	68003922	-0,3	10-19	MF	otherwise Healthy		direct enzyme-linked immunosorbent assay	non-Proteomics
P02808	Statherin		x			x	68003922	-2,1	Children					
P02810	Salivary acidic proline-rich phosphoprotein 1/2 (Db-s)		x			x	68003922	-1,2	Children					
P02814	Submaxillary gland androgen-regulated protein 3B		x			x	68003922	-1,3	Children					
P04745	Alpha-amylase 1	x				x	68003922	3,2	42-68	MF		tissue samples	Immunohistochemistry	non-Proteomics
P05109	Protein S100-A8		x			x	68003922	1,4	Children					
P05231	Interleukin-6				x	x	68003922	29,2		MF	non-smokers. healthy individuals with no medication which could influence periodontitis except for diabetes type 1 medication, not pregnant womenwithout using any contraceptive treatment or lactant. All non-smoking individuals	gingival tissue samples	RNA extraction and measured by biophotometer	Proteomics
P06702	Protein S100-A9		x			x	68003922	1,6	Children					
P06865	Beta-hexosaminidase subunit alpha		x			x	68003922	1,3	20-35	MF	non-smokers		Chatterjee et al. Method (1975)	Proteomics
P06865	Beta-hexosaminidase subunit alpha		x			x	68003922	2,3	20-35	MF	Smokers. periodontally healthy, excluded: patients under pharmacological treatment, hormonal contraception, pregnants.		Chatterjee et al. Method (1975)	Proteomics
P07686	Beta-hexosaminidase subunit beta		x			x	68003922	-0,12	20-35	MF	non-smokers. periodontally healthy, excluded: patients under pharmacological treatment, hormonal contraception, pregnants.		Chatterjee et al. Method (1975)	Proteomics
P07686	Beta-hexosaminidase subunit beta		x			x	68003922	3	20-35	MF	smokers. periodontally healthy, excluded: patients under pharmacological treatment, hormonal contraception, pregnants.		Chatterjee et al. Method (1975)	Proteomics
P08246	Neutrophil elastase			x		x	68003922	1,1	26-51	MF	average was a smoker for 6,5+3,2 yrs. dmt-1 patients for 10,03+5,73 yrs		ELISA	non-Proteomics
P09228	Cystatin-SA (Cystatin-2)		x			x	68003922		Children					
P10145	Interleukin-8 (IL-8)				x	x	68003922	35		MF	non-smokers. healthy individuals with no medication which could influence periodontitis except for diabetes type 1 medication, not pregnant womenwithout using any contraceptive treatment or lactant. All non-smoking individuals	gingival tissue samples	RNA extraction and measured by biophotometer	Proteomics
P12838	Neutrophil defensin 4 (Defensin, alpha 4) (HNP-4) (HP-4)		x			x	68003922	1,9	Children					

P13861	cAMP-dependent protein kinase type II-alpha regulatory subunit	x			x	68003922	1,4	42-68	MF		tissue samples	Immunohistochemistry	non-Proteomics
P15515	Histatin-1		x		x	68003922	-2,2	Children					
P15516	Histatin-3		x		x	68003922	-1,1	Children					
P16278	Beta-galactosidase		x		x	68003922	-0,3	20-35	MF	non-smokers. periodontally healthy, excluded: patients under pharmacological treatment, hormonal contraception, pregnants.		Chatterjee et al. Method (1975)	Proteomics
P16278	Beta-galactosidase		x		x	68003922	-0,23	20-35	MF	smokers. periodontally healthy, excluded: patients under pharmacological treatment, hormonal contraception, pregnants.		Chatterjee et al. Method (1975)	Proteomics
P18510	Interleukin-1 receptor antagonist protein (IL-1RN)				x	x	68003922	1,7	MF	non-smokers. healthy individuals with no medication which could influence periodontitis except for diabetes type 1 medication, not pregnant womenwithout using any contraceptive treatment or lactant. All non-smoking individuals	gingival tissue samples	RNA extraction and measured by biophotometer	Proteomics
P22301	Interleukin-10 (IL-10)				x	x	68003922	-1,8	MF	non-smokers. healthy individuals with no medication which could influence periodontitis except for diabetes type 1 medication, not pregnant womenwithout using any contraceptive treatment or lactant. All non-smoking individuals	gingival tissue samples	RNA extraction and measured by biophotometer	Proteomics
P31323	cAMP-dependent protein kinase type II-beta	x			x	68003922	1,4	42-68	MF		tissue samples	Immunohistochemistry	non-Proteomics
P59665	Neutrophil defensin 1		x		x	68003922	1,9	Children					
P59666	Neutrophil defensin 3		x		x	68003922	+	Children					
P62328	Thymosin beta-4		x		x	68003922		Children					
P63313	Thymosin beta-10		x		x	68003922		Children					
Q9Y298	IgG VH protein		x		x	68003922	2,4	10-19	MF	otherwise Healthy		direct enzyme-linked immunosorbent assay	non-Proteomics

Citation (NCBI ID)
9558543
17944678
20585025
20585025
10989322
17944678
17944678
17944678
18976260
20585025
20585025
20585025
20456617
20585025
17944678
20585025
16700736
16700736
16700736
16700736
11453115
20585025
17944678
20585025

20456617
20585025
20585025
16700736
16700736
17944678
17944678
20456617
20585025
20585025
20585025
20585025
18976260

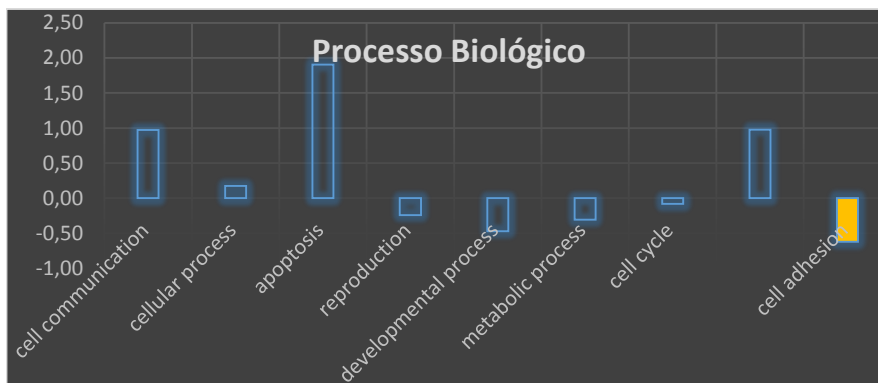
P31025			x	x	-1,59	55-75	MF	Non-smoker; Non-alcoholic; no pregnancy	Patients were asked to refrain from drinking, eating, and practicing any oral hygiene habits 2 hours before sample collection. All sample collection was completed before lunch (9 am–12 pm). B4 ml of unstimulated whole saliva sample was collected and centrifuged. The supernatant was placed into aliquots of 250 ml and immediately frozen in liquid nitrogen.	d label-free differential protein expression analysis using multidimensional liquid chromatography/tandem mass spectrometry (2D-LC-MS/MS)			22314925
P48723			x	x	3,23	55-75	MF	Non-smoker; Non-alcoholic; no pregnancy	Patients were asked to refrain from drinking, eating, and practicing any oral hygiene habits 2 hours before sample collection. All sample collection was completed before lunch (9 am–12 pm). B4 ml of unstimulated whole saliva sample was collected and centrifuged. The supernatant was placed into aliquots of 250 ml and immediately frozen in liquid nitrogen.	d label-free differential protein expression analysis using multidimensional liquid chromatography/tandem mass spectrometry (2D-LC-MS/MS)			22314925
P55042			x	x	-63,41	55-75	MF	Non-smoker; Non-alcoholic; no pregnancy	Patients were asked to refrain from drinking, eating, and practicing any oral hygiene habits 2 hours before sample collection. All sample collection was completed before lunch (9 am–12 pm). B4 ml of unstimulated whole saliva sample was collected and centrifuged. The supernatant was placed into aliquots of 250 ml and immediately frozen in liquid nitrogen.	d label-free differential protein expression analysis using multidimensional liquid chromatography/tandem mass spectrometry (2D-LC-MS/MS)			22314925
Q53EP0			x	x	-2,17	55-75	MF	Non-smoker; Non-alcoholic; no pregnancy	Patients were asked to refrain from drinking, eating, and practicing any oral hygiene habits 2 hours before sample collection. All sample collection was completed before lunch (9 am–12 pm). B4 ml of unstimulated whole saliva sample was collected and centrifuged. The supernatant was placed into aliquots of 250 ml and immediately frozen in liquid nitrogen.	d label-free differential protein expression analysis using multidimensional liquid chromatography/tandem mass spectrometry (2D-LC-MS/MS)			22314925
Q5F1R6			x	x	-9,81	55-75	MF	Non-smoker; Non-alcoholic; no pregnancy	Patients were asked to refrain from drinking, eating, and practicing any oral hygiene habits 2 hours before sample collection. All sample collection was completed before lunch (9 am–12 pm). B4 ml of unstimulated whole saliva sample was collected and centrifuged. The supernatant was placed into aliquots of 250 ml and immediately frozen in liquid nitrogen.	d label-free differential protein expression analysis using multidimensional liquid chromatography/tandem mass spectrometry (2D-LC-MS/MS)			22314925
Q8NGY0			x	x	-9,18	55-75	MF	Non-smoker; Non-alcoholic; no pregnancy	Patients were asked to refrain from drinking, eating, and practicing any oral hygiene habits 2 hours before sample collection. All sample collection was completed before lunch (9 am–12 pm). B4 ml of unstimulated whole saliva sample was collected and centrifuged. The supernatant was placed into aliquots of 250 ml and immediately frozen in liquid nitrogen.	d label-free differential protein expression analysis using multidimensional liquid chromatography/tandem mass spectrometry (2D-LC-MS/MS)			22314925
Q8TAX7			x	x	-4,43	55-75	MF	Non-smoker; Non-alcoholic; no pregnancy	Patients were asked to refrain from drinking, eating, and practicing any oral hygiene habits 2 hours before sample collection. All sample collection was completed before lunch (9 am–12 pm). B4 ml of unstimulated whole saliva sample was collected and centrifuged. The supernatant was placed into aliquots of 250 ml and immediately frozen in liquid nitrogen.	d label-free differential protein expression analysis using multidimensional liquid chromatography/tandem mass spectrometry (2D-LC-MS/MS)			22314925
Q99102			x	x	13,17	55-75	MF	Non-smoker; Non-alcoholic; no pregnancy	Patients were asked to refrain from drinking, eating, and practicing any oral hygiene habits 2 hours before sample collection. All sample collection was completed before lunch (9 am–12 pm). B4 ml of unstimulated whole saliva sample was collected and centrifuged. The supernatant was placed into aliquots of 250 ml and immediately frozen in liquid nitrogen.	d label-free differential protein expression analysis using multidimensional liquid chromatography/tandem mass spectrometry (2D-LC-MS/MS)			22314925
Q9HC84			x	x	-2,16	55-75	MF	Non-smoker; Non-alcoholic; no pregnancy	Patients were asked to refrain from drinking, eating, and practicing any oral hygiene habits 2 hours before sample collection. All sample collection was completed before lunch (9 am–12 pm). B4 ml of unstimulated whole saliva sample was collected and centrifuged. The supernatant was placed into aliquots of 250 ml and immediately frozen in liquid nitrogen.	d label-free differential protein expression analysis using multidimensional liquid chromatography/tandem mass spectrometry (2D-LC-MS/MS)			22314925
Q9HC84			x	x	-1,82	55-75	MF	Non-smoker; Non-alcoholic; no pregnancy	Patients were asked to refrain from drinking, eating, and practicing any oral hygiene habits 2 hours before sample collection. All sample collection was completed before lunch (9 am–12 pm). B4 ml of unstimulated whole saliva sample was collected and centrifuged. The supernatant was placed into aliquots of 250 ml and immediately frozen in liquid nitrogen.	d label-free differential protein expression analysis using multidimensional liquid chromatography/tandem mass spectrometry (2D-LC-MS/MS)			22314925
Q9UIV8			x	x	6,54	55-75	MF	Non-smoker; Non-alcoholic; no pregnancy	Patients were asked to refrain from drinking, eating, and practicing any oral hygiene habits 2 hours before sample collection. All sample collection was completed before lunch (9 am–12 pm). B4 ml of unstimulated whole saliva sample was collected and centrifuged. The supernatant was placed into aliquots of 250 ml and immediately frozen in liquid nitrogen.	d label-free differential protein expression analysis using multidimensional liquid chromatography/tandem mass spectrometry (2D-LC-MS/MS)			22314925
Q9Y5J9			x	x	1,90	55-75	MF	Non-smoker; Non-alcoholic; no pregnancy	Patients were asked to refrain from drinking, eating, and practicing any oral hygiene habits 2 hours before sample collection. All sample collection was completed before lunch (9 am–12 pm). B4 ml of unstimulated whole saliva sample was collected and centrifuged. The supernatant was placed into aliquots of 250 ml and immediately frozen in liquid nitrogen.	d label-free differential protein expression analysis using multidimensional liquid chromatography/tandem mass spectrometry (2D-LC-MS/MS)			22314925
Q6CRY5			x	x	702,46	55-75	MF	Non-smoker; Non-alcoholic; no pregnancy	Patients were asked to refrain from drinking, eating, and practicing any oral hygiene habits 2 hours before sample collection. All sample collection was completed before lunch (9 am–12 pm). B4 ml of unstimulated whole saliva sample was collected and centrifuged. The supernatant was placed into aliquots of 250 ml and immediately frozen in liquid nitrogen.	d label-free differential protein expression analysis using multidimensional liquid chromatography/tandem mass spectrometry (2D-LC-MS/MS)			22314925
Q92210			x	x	4,32	55-75	MF	Non-smoker; Non-alcoholic; no pregnancy	Patients were asked to refrain from drinking, eating, and practicing any oral hygiene habits 2 hours before sample collection. All sample collection was completed before lunch (9 am–12 pm). B4 ml of unstimulated whole saliva sample was collected and centrifuged. The supernatant was placed into aliquots of 250 ml and immediately frozen in liquid nitrogen.	d label-free differential protein expression analysis using multidimensional liquid chromatography/tandem mass spectrometry (2D-LC-MS/MS)			22314925
P10809			x	x	4,25	18-66	MF	Non-smoker; Non-alcoholic; no pregnancy	Other studies on HSPs have attempted to control for environmental stresses by asking patients to refrain from exertion, smoking, caffeine and alcohol for 2–24 h and not taking samples from subjects with active bacterial or viral infection or other illness. Similar restrictions were applied to our participants.	ELISA			21748374

P01133			x	x	1,21	77 years old; female	MF	Non-smoker; Non-alcoholic; no pregnancy	Patients were instructed to expectorate every 6 h into pre-labeled sterile collection tubes. Unstimulated whole resting saliva (approximately 3 ml) was obtained from each patient by passive expectoration at 0, 6, 12, 18, 24, 30, 36 and 42 h. Patients were asked to collect approximately 3 ml of whole saliva without the assistance of chewing material. No time limit was enforced to collect the requested volume of material. Samples were stored at 4°C until evaluated.	Quantikine Human EGF Immunoassay				10989322
P10645			x	x	9,50		MF	Non-smoker; Non-alcoholic; no pregnancy	Saliva samples were taken from ST patients each with or without diabetes type 2. All samples were taken without oral salivary gland stimulation. The patients were instructed to salivate directly into Falcon tubes (Falcon FT ml, Germany) including FT11 RL (QV,Qf,Qd) buff er with protease inhibitors (Complete cocktail tablets, Roche, Germany) for preserving proteins from degradation processes.	Electrophoresis		biomarker f	20192923	
P01876	x			x	1,30	34-65	MF	Non-smoker; Non-alcoholic; no pregnancy	Subjects were requested not to eat, drink or perform oral hygiene measures after midnight the night before saliva collections. Unstimulated whole (UW) saliva, stimulated parotid (SP) and stimulated (SS) and unstimulated (US) submandibular/sublingual saliva were collected from each subject between 8:00 and 10:00 a.m. SP saliva was collected using a modified Carlson-Crittenden cup (13) and US and SS saliva was collected with a micropipette connected to a mini-vacuum pump (14). Salivary stimulation was achieved by swabbing the lateral surfaces of the tongue with 0.1 mol/L (2% w/v) citric acid every 30 s. The sequence and times of collection of saliva was as follows: UW (5 min); US (5 min); SP (5 min after 2 min to establish a flow); SS (3 min).	ELISA			11014514	
P61626	x			x	1,26	34-65	MF	Non-smoker; Non-alcoholic; no pregnancy	Subjects were requested not to eat, drink or perform oral hygiene measures after midnight the night before saliva collections. Unstimulated whole (UW) saliva, stimulated parotid (SP) and stimulated (SS) and unstimulated (US) submandibular/sublingual saliva were collected from each subject between 8:00 and 10:00 a.m. SP saliva was collected using a modified Carlson-Crittenden cup (13) and US and SS saliva was collected with a micropipette connected to a mini-vacuum pump (14). Salivary stimulation was achieved by swabbing the lateral surfaces of the tongue with 0.1 mol/L (2% w/v) citric acid every 30 s. The sequence and times of collection of saliva was as follows: UW (5 min); US (5 min); SP (5 min after 2 min to establish a flow); SS (3 min).	ELISA			11014514	
P02788	x			x	1,70	34-65	MF	Non-smoker; Non-alcoholic; no pregnancy	Subjects were requested not to eat, drink or perform oral hygiene measures after midnight the night before saliva collections. Unstimulated whole (UW) saliva, stimulated parotid (SP) and stimulated (SS) and unstimulated (US) submandibular/sublingual saliva were collected from each subject between 8:00 and 10:00 a.m. SP saliva was collected using a modified Carlson-Crittenden cup (13) and US and SS saliva was collected with a micropipette connected to a mini-vacuum pump (14). Salivary stimulation was achieved by swabbing the lateral surfaces of the tongue with 0.1 mol/L (2% w/v) citric acid every 30 s. The sequence and times of collection of saliva was as follows: UW (5 min); US (5 min); SP (5 min after 2 min to establish a flow); SS (3 min).	ELISA			11014514	
P02768	x			x	1,25	34-65	MF	Non-smoker; Non-alcoholic; no pregnancy	Subjects were requested not to eat, drink or perform oral hygiene measures after midnight the night before saliva collections. Unstimulated whole (UW) saliva, stimulated parotid (SP) and stimulated (SS) and unstimulated (US) submandibular/sublingual saliva were collected from each subject between 8:00 and 10:00 a.m. SP saliva was collected using a modified Carlson-Crittenden cup (13) and US and SS saliva was collected with a micropipette connected to a mini-vacuum pump (14). Salivary stimulation was achieved by swabbing the lateral surfaces of the tongue with 0.1 mol/L (2% w/v) citric acid every 30 s. The sequence and times of collection of saliva was as follows: UW (5 min); US (5 min); SP (5 min after 2 min to establish a flow); SS (3 min).	ELISA			11014514	
P22079	x			x	2,28	34-65	MF	Non-smoker; Non-alcoholic; no pregnancy	Subjects were requested not to eat, drink or perform oral hygiene measures after midnight the night before saliva collections. Unstimulated whole (UW) saliva, stimulated parotid (SP) and stimulated (SS) and unstimulated (US) submandibular/sublingual saliva were collected from each subject between 8:00 and 10:00 a.m. SP saliva was collected using a modified Carlson-Crittenden cup (13) and US and SS saliva was collected with a micropipette connected to a mini-vacuum pump (14). Salivary stimulation was achieved by swabbing the lateral surfaces of the tongue with 0.1 mol/L (2% w/v) citric acid every 30 s. The sequence and times of collection of saliva was as follows: UW (5 min); US (5 min); SP (5 min after 2 min to establish a flow); SS (3 min).	ELISA			11014514	
P05164	x			x	3,86	34-65	MF	Non-smoker; Non-alcoholic; no pregnancy	Subjects were requested not to eat, drink or perform oral hygiene measures after midnight the night before saliva collections. Unstimulated whole (UW) saliva, stimulated parotid (SP) and stimulated (SS) and unstimulated (US) submandibular/sublingual saliva were collected from each subject between 8:00 and 10:00 a.m. SP saliva was collected using a modified Carlson-Crittenden cup (13) and US and SS saliva was collected with a micropipette connected to a mini-vacuum pump (14). Salivary stimulation was achieved by swabbing the lateral surfaces of the tongue with 0.1 mol/L (2% w/v) citric acid every 30 s. The sequence and times of collection of saliva was as follows: UW (5 min); US (5 min); SP (5 min after 2 min to establish a flow); SS (3 min).	ELISA			11014514	
P01876		x		x	1,25	34-65	MF	Non-smoker; Non-alcoholic; no pregnancy	Subjects were requested not to eat, drink or perform oral hygiene measures after midnight the night before saliva collections. Unstimulated whole (UW) saliva, stimulated parotid (SP) and stimulated (SS) and unstimulated (US) submandibular/sublingual saliva were collected from each subject between 8:00 and 10:00 a.m. SP saliva was collected using a modified Carlson-Crittenden cup (13) and US and SS saliva was collected with a micropipette connected to a mini-vacuum pump (14). Salivary stimulation was achieved by swabbing the lateral surfaces of the tongue with 0.1 mol/L (2% w/v) citric acid every 30 s. The sequence and times of collection of saliva was as follows: UW (5 min); US (5 min); SP (5 min after 2 min to establish a flow); SS (3 min).	ELISA			11014514	
P61626		x		x	1,15	34-65	MF	Non-smoker; Non-alcoholic; no pregnancy	Subjects were requested not to eat, drink or perform oral hygiene measures after midnight the night before saliva collections. Unstimulated whole (UW) saliva, stimulated parotid (SP) and stimulated (SS) and unstimulated (US) submandibular/sublingual saliva were collected from each subject between 8:00 and 10:00 a.m. SP saliva was collected using a modified Carlson-Crittenden cup (13) and US and SS saliva was collected with a micropipette connected to a mini-vacuum pump (14). Salivary stimulation was achieved by swabbing the lateral surfaces of the tongue with 0.1 mol/L (2% w/v) citric acid every 30 s. The sequence and times of collection of saliva was as follows: UW (5 min); US (5 min); SP (5 min after 2 min to establish a flow); SS (3 min).	ELISA			11014514	
P02788		x		x	1,59	34-65	MF	Non-smoker; Non-alcoholic; no pregnancy	Subjects were requested not to eat, drink or perform oral hygiene measures after midnight the night before saliva collections. Unstimulated whole (UW) saliva, stimulated parotid (SP) and stimulated (SS) and unstimulated (US) submandibular/sublingual saliva were collected from each subject between 8:00 and 10:00 a.m. SP saliva was collected using a modified Carlson-Crittenden cup (13) and US and SS saliva was collected with a micropipette connected to a mini-vacuum pump (14). Salivary stimulation was achieved by swabbing the lateral surfaces of the tongue with 0.1 mol/L (2% w/v) citric acid every 30 s. The sequence and times of collection of saliva was as follows: UW (5 min); US (5 min); SP (5 min after 2 min to establish a flow); SS (3 min).	ELISA			11014514	
P02768		x		x	1,42	34-65	MF	Non-smoker; Non-alcoholic; no pregnancy	Subjects were requested not to eat, drink or perform oral hygiene measures after midnight the night before saliva collections. Unstimulated whole (UW) saliva, stimulated parotid (SP) and stimulated (SS) and unstimulated (US) submandibular/sublingual saliva were collected from each subject between 8:00 and 10:00 a.m. SP saliva was collected using a modified Carlson-Crittenden cup (13) and US and SS saliva was collected with a micropipette connected to a mini-vacuum pump (14). Salivary stimulation was achieved by swabbing the lateral surfaces of the tongue with 0.1 mol/L (2% w/v) citric acid every 30 s. The sequence and times of collection of saliva was as follows: UW (5 min); US (5 min); SP (5 min after 2 min to establish a flow); SS (3 min).	ELISA			11014514	
Q9UBU3			x	x	-2,10	38-66	MF	Non-smoker; Non-alcoholic; no pregnancy	Subjects were asked not to eat, smoke or drink (except water) for an overnight fast prior to collection of saliva samples. Their diets were similar with respect to protein content and uptake of fat and carbohydrates. Socioeconomic status was similar for both groups (survey data).	Ghrelin was measured in unstimulated total saliva using the same human-ghrelin-RIA kit, which is designed to test any biological fluid with sufficient levels of the peptide to be determined.			17244479	
Q9UBU3			x	x	-1,32	38-66	MF	Non-smoker; Non-alcoholic; no pregnancy	Subjects were asked not to eat, smoke or drink (except water) for an overnight fast prior to collection of saliva samples. Their diets were similar with respect to protein content and uptake of fat and carbohydrates. Socioeconomic status was similar for both groups (survey data).	Ghrelin was measured in unstimulated total saliva using the same human-ghrelin-RIA kit, which is designed to test any biological fluid with sufficient levels of the peptide to be determined.			17244479	
Q9UBU3			x	x	-1,63	38-66	MF	Non-smoker; Non-alcoholic; no pregnancy	Subjects were asked not to eat, smoke or drink (except water) for an overnight fast prior to collection of saliva samples. Their diets were similar with respect to protein content and uptake of fat and carbohydrates. Socioeconomic status was similar for both groups (survey data).	Ghrelin was measured in unstimulated total saliva using the same human-ghrelin-RIA kit, which is designed to test any biological fluid with sufficient levels of the peptide to be determined.			17244479	

Q9UBU3			x	x	-1,23	38-66	MF	Non-smoker; Non-alcoholic; no pregnancy	Subjects were asked not to eat, smoke or drink (except water) for an overnight fast prior to collection of saliva samples. Their diets were similar with respect to protein content and uptake of fat and carbohydrates. Socioeconomic status was similar for both groups (survey data).	Ghrelin was measured in unstimulated total saliva using the same human-ghrelin-RIA kit, which is designed to test any biological fluid with sufficient levels of the peptide to be determined.			17244479
P04745			x	x	1,25	38-66	MF	Non-smoker; Non-alcoholic; no pregnancy	Subjects were asked not to eat, smoke or drink (except water) for an overnight fast prior to collection of saliva samples. Their diets were similar with respect to protein content and uptake of fat and carbohydrates. Socioeconomic status was similar for both groups (survey data).	amylase activity was determined by the colorimetric method of Winn-Deen and coworkers			17244479
P04745			x	x	1,24	38-66	MF	Non-smoker; Non-alcoholic; no pregnancy	Subjects were asked not to eat, smoke or drink (except water) for an overnight fast prior to collection of saliva samples. Their diets were similar with respect to protein content and uptake of fat and carbohydrates. Socioeconomic status was similar for both groups (survey data).	amylase activity was determined by the colorimetric method of Winn-Deen and coworkers			17244479
P02768				x	1,19	45-64	MF	The study included patients with habits of smoking and alcohol consumption	Subjects were told not to eat or smoke for one hour prior to the examination.	colorimetric methods			11005153
P04745			x	x	1,14	45-64	MF	The study included patients with habits of smoking and alcohol consumption	Subjects were told not to eat or smoke for one hour prior to the examination.	Boehringer MPR 3 a-amylase EPS method			11005153
P05231			x	x	0,00	35-65	MF	Non-smoker; Non-alcoholic; no pregnancy	Subjects refrained from eating, drinking, and oral hygiene for 2 hours prior to saliva collection.	ELISA			20192865

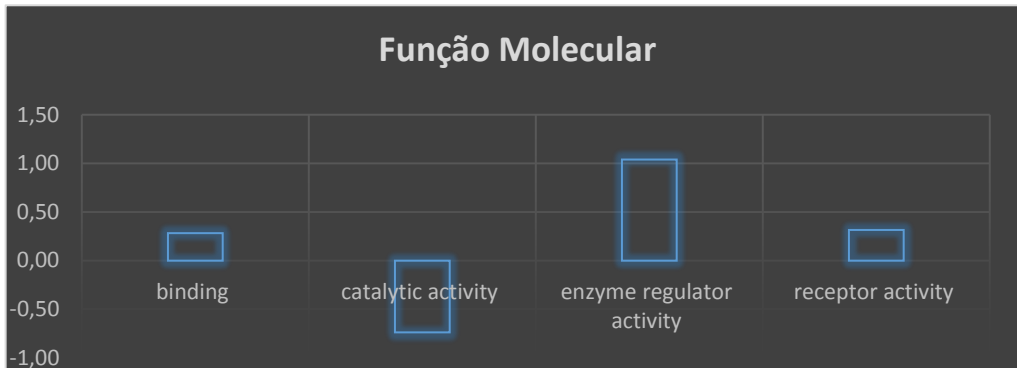
Biological Process	Oraloma Normal	Diabetes esperado	Diabetes observado	Diferença fracional	P value
cell communication	544	6,598	13	0,97	0,007013492
cellular process	912	11,061	13	0,18	0,287905016
apoptosis	142	1,722	5	1,90	0,026555207
reproduction	109	1,322	1	-0,24	0,741568258
developmental process	469	5,688	3	-0,47	0,942642667
metabolic process	1307	15,852	11	-0,31	0,977046763
cell cycle	269	3,263	3	-0,08	0,648398234
immune system process	459	5,567	11	0,98	0,01466063
cell adhesion	219	2,656	1	-0,62	0,938322452
Total Oraloma normal	2391				
Total Diabetes 1	29				

* Log of fractional difference (observed vs expected) is calculated for each testing list as: $(\# \text{ genes for the category} - \# \text{ genes expected}) / \# \text{ genes expected}$



ach
s

Função Molecular	Oraloma Normal	Diabetes esperado	Diabetes observado	Diferença fracional	
binding	965	11,70431	15	0,28	0,1452
catalytic activity	946	11,47386	3	-0,74	0,999912
enzyme regulator activity	202	2,450021	5	1,04	0,093208
receptor activity	188	2,280217	3	0,32	0,401688



* Log of fractional difference (observed vs expected) is calculated for each testing list as: $(\# \text{ genes for the category} - \# \text{ genes expected}) / \# \text{ genes expected}$

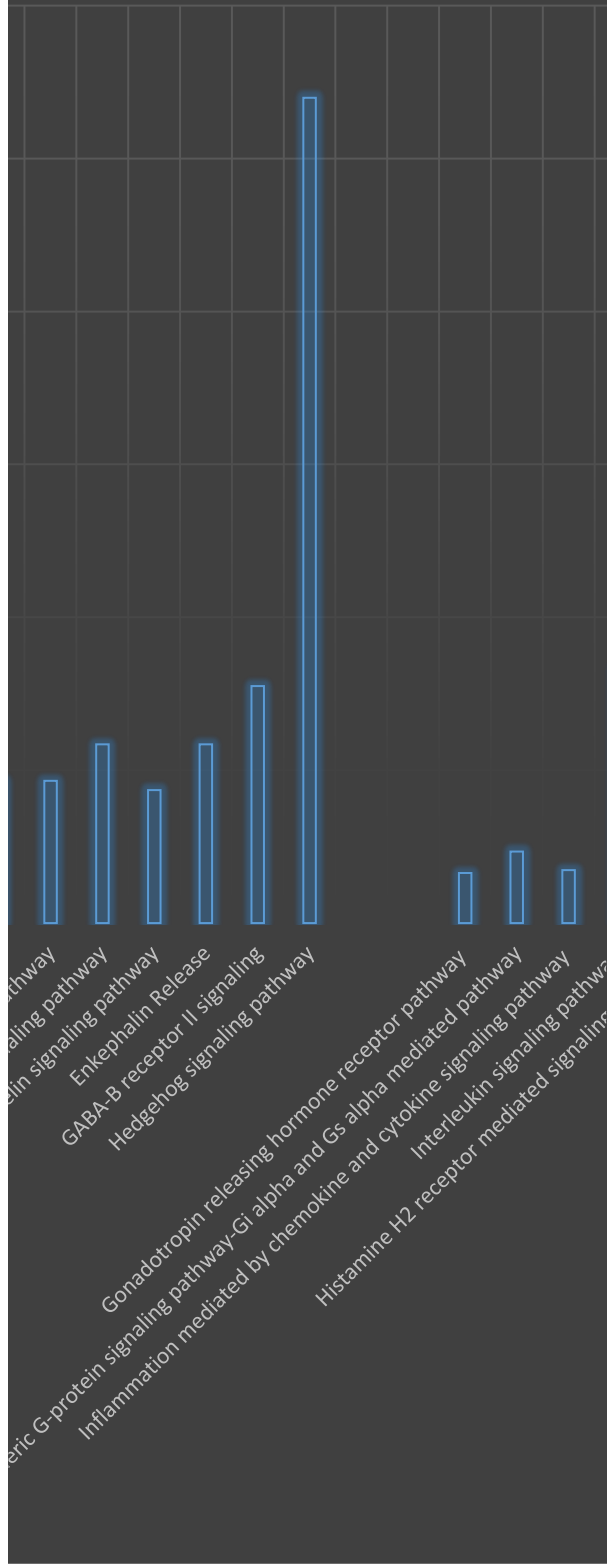
each
es

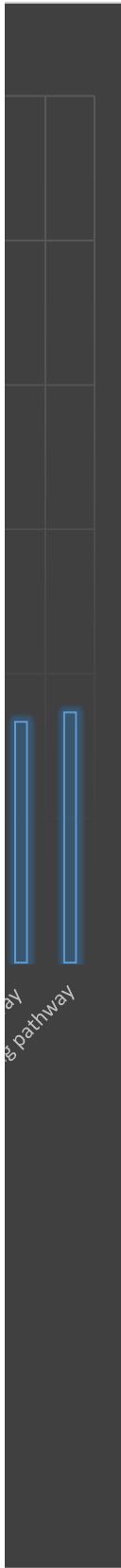
Pathway	Oraloma Normal	Diabetes esperado
Alzheimer disease-presenilin pathway	23	0,28
Apoptosis signaling pathway	23	0,28
Beta1 adrenergic receptor signaling pathway	16	0,19
Beta2 adrenergic receptor signaling pathway	16	0,19
5HT1 type receptor mediated signaling pathway	13	0,16
Endothelin signaling pathway	17	0,21
Enkephalin Release	13	0,16
GABA-B receptor II signaling	10	0,12
Hedgehog signaling pathway	3	0,04
Gonadotropin releasing hormone receptor pathway	58	0,70
Heterotrimeric G-protein signaling pathway-Gi alpha and Gs alpha mediated p	29	0,35
Inflammation mediated by chemokine and cytokine signaling pathway	74	0,90
Interleukin signaling pathway	14	0,17
Histamine H2 receptor mediated signaling pathway	9	0,11
Interferon-gamma signaling pathway	4	0,05
Metabotropic glutamate receptor group I pathway	3	0,04
Metabotropic glutamate receptor group II pathway	16	0,19
Metabotropic glutamate receptor group III pathway	12	0,15
Muscarinic acetylcholine receptor 2 and 4 signaling pathway	16	0,19
Transcription regulation by bZIP transcription factor	4	0,05
Wnt signaling pathway	43	0,52

Devido ao nº elevado de Pathways relativo ao OralOma Normal (125) , apresentei apenas os comuns com

* Log of fractional difference (observed vs expected) is calculated for each testing list as: $(\# \text{ genes for the category} - \# \text{ genes expected}) / \# \text{ genes expected}$

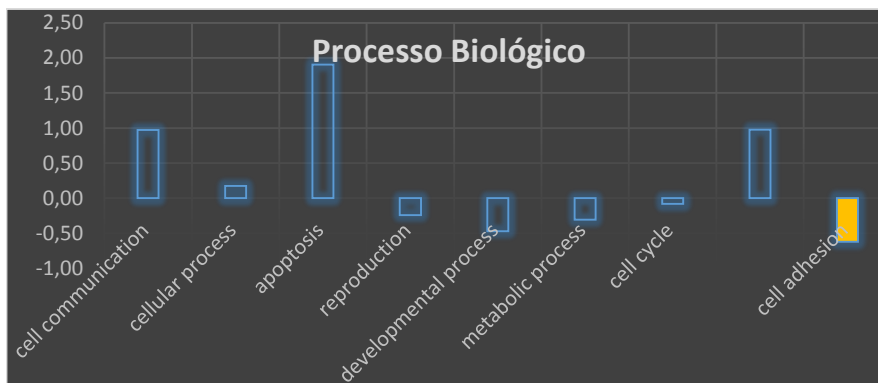
Pathways





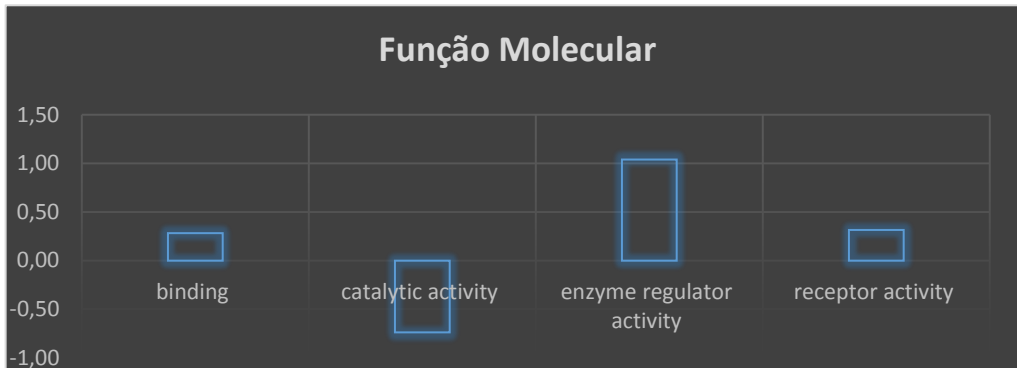
Biological Process	Oraloma Normal	Diabetes esperado	Diabetes observado	Diferença fracional	P value
cell communication	544	6,598	13	0,97	0,007013492
cellular process	912	11,061	13	0,18	0,287905016
apoptosis	142	1,722	5	1,90	0,026555207
reproduction	109	1,322	1	-0,24	0,741568258
developmental process	469	5,688	3	-0,47	0,942642667
metabolic process	1307	15,852	11	-0,31	0,977046763
cell cycle	269	3,263	3	-0,08	0,648398234
immune system process	459	5,567	11	0,98	0,01466063
cell adhesion	219	2,656	1	-0,62	0,938322452
Total Oraloma normal	2391				
Total Diabetes 1	29				

* Log of fractional difference (observed vs expected) is calculated for each testing list as: $(\# \text{ genes for the category} - \# \text{ genes expected}) / \# \text{ genes expected}$



ach
s

Função Molecular	Oraloma Normal	Diabetes esperado	Diabetes observado	Diferença fracional	
binding	965	11,70431	15	0,28	0,1452
catalytic activity	946	11,47386	3	-0,74	0,999912
enzyme regulator activity	202	2,450021	5	1,04	0,093208
receptor activity	188	2,280217	3	0,32	0,401688



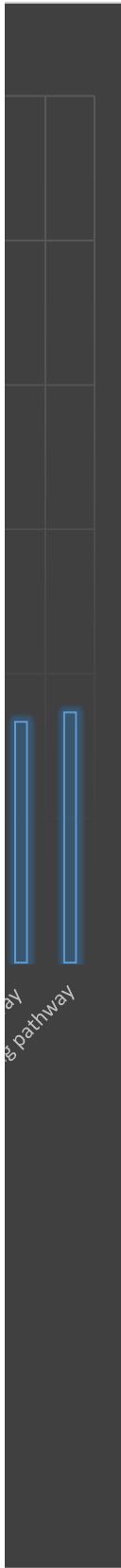
* Log of fractional difference (observed vs expected) is calculated for each testing list as: $(\# \text{ genes for the category} - \# \text{ genes expected}) / \# \text{ genes expected}$

each
es

Pathway	Oraloma Normal	Diabetes esperado
Alzheimer disease-presenilin pathway	23	0,28
Apoptosis signaling pathway	23	0,28
Beta1 adrenergic receptor signaling pathway	16	0,19
Beta2 adrenergic receptor signaling pathway	16	0,19
5HT1 type receptor mediated signaling pathway	13	0,16
Endothelin signaling pathway	17	0,21
Enkephalin Release	13	0,16
GABA-B receptor II signaling	10	0,12
Hedgehog signaling pathway	3	0,04
Gonadotropin releasing hormone receptor pathway	58	0,70
Heterotrimeric G-protein signaling pathway-Gi alpha and Gs alpha mediated p	29	0,35
Inflammation mediated by chemokine and cytokine signaling pathway	74	0,90
Interleukin signaling pathway	14	0,17
Histamine H2 receptor mediated signaling pathway	9	0,11
Interferon-gamma signaling pathway	4	0,05
Metabotropic glutamate receptor group I pathway	3	0,04
Metabotropic glutamate receptor group II pathway	16	0,19
Metabotropic glutamate receptor group III pathway	12	0,15
Muscarinic acetylcholine receptor 2 and 4 signaling pathway	16	0,19
Transcription regulation by bZIP transcription factor	4	0,05
Wnt signaling pathway	43	0,52

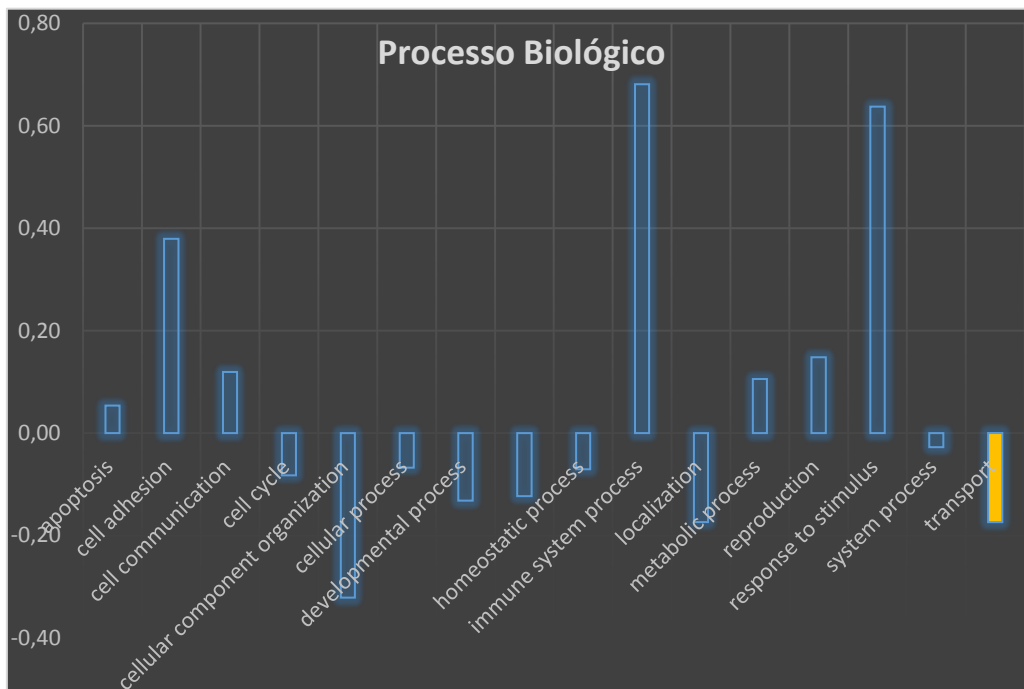
Devido ao nº elevado de Pathways relativo ao OralOma Normal (125) , apresentei apenas os comuns com

* Log of fractional difference (observed vs expected) is calculated for each testing list as: $(\# \text{ genes for the category} - \# \text{ genes expected}) / \# \text{ genes expected}$



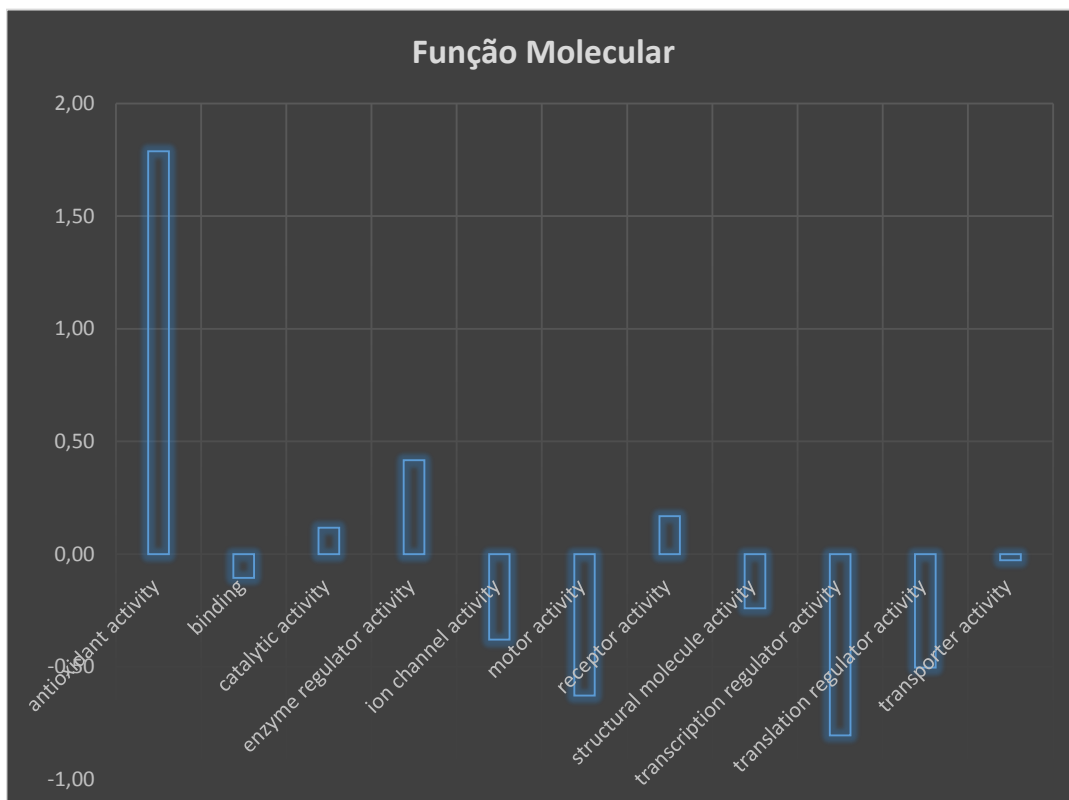
Biological Process	Oraloma Normal	Diabetes esperado	Diabetes observado	Diferença fracional	P value
apoptosis	127	22,780	24	0,05	0,43
cell adhesion	194	34,797	48	0,38	0,02
cell communication	503	90,221	101	0,12	0,11
cell cycle	237	42,510	39	-0,08	0,74
cellular component organization	304	54,527	37	-0,32	1,00
cellular process	843	151,206	141	-0,07	0,86
developmental process	411	73,720	64	-0,13	0,91
generation of precursor metabolites and energ	89	15,964	14	-0,12	0,73
homeostatic process	30	5,381	5	-0,07	0,63
immune system process	398	71,388	120	0,68	0,00
localization	27	4,843	4	-0,17	0,71
metabolic process	1261	226,181	250	0,11	0,01
reproduction	68	12,197	14	0,15	0,34
response to stimulus	286	51,299	84	0,64	0,00
system process	281	50,402	49	-0,03	0,61
transport	459	82,329	68	-0,17	0,97
Total Oraloma normal	2336				
Total Diabetes	419				

* Log of fractional difference (observed vs expected) is calculated for each testing list as: ($\#$ genes for the category - $\#$ genes expected)/ $\#$ genes expected



Função Molecular	a Normal	esperado	Diabetes observado	a fracional	P value
antioxidant activity	16	2,87	8	1,79	0,01
binding	910	163,22	146	-0,11	0,96
catalytic activity	909	163,04	182	0,12	0,03
enzyme regulator activity	181	32,47	46	0,42	0,01
ion channel activity	27	4,84	3	-0,38	0,86
motor activity	30	5,38	2	-0,63	0,97
receptor activity	167	29,95	35	0,17	0,19
structural molecule activity	426	76,41	58	-0,24	0,99
transcription regulator activity	86	15,43	3	-0,81	1,00
translation regulator activity	45	8,07	4	-0,50	0,96
transporter activity	149	26,73	26	-0,03	0,59
Total Oraloma normal	2336				
Total Diabetes	419				

* Log of fractional difference (observed vs expected) is calculated for each testing list as: $(\# \text{ genes for the category} - \# \text{ genes expected}) / \# \text{ genes expected}$



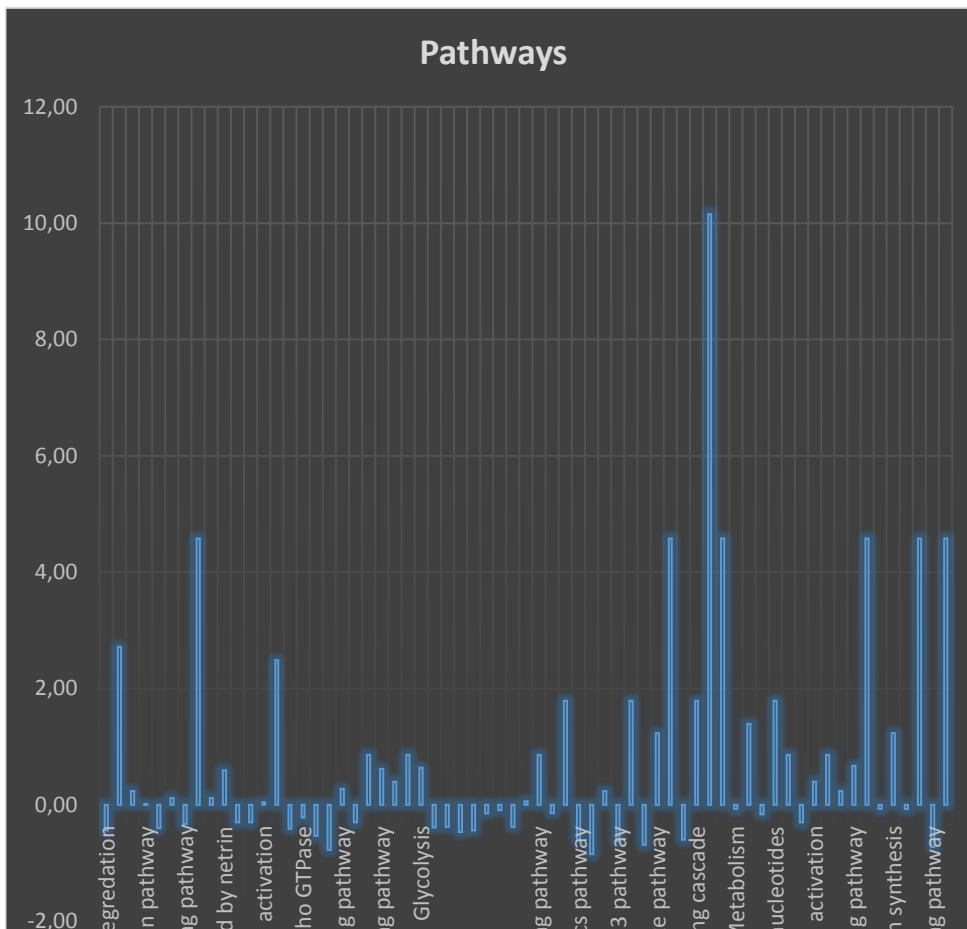
Pathway	Oraloma Normal	Diabetes esperado	Diabetes observado	Diferença fracional	P value
5-Hydroxytryptamine degradation	10	1,79	1,00	-0,44	0,83
Adenine and hypoxanthine salvage pathway	3	0,54	2,00	2,72	0,10
Alzheimer disease-amyloid secretase pathway	9	1,61	2,00	0,24	0,48
Alzheimer disease-presenilin pathway	22	3,95	4,00	0,01	0,56
Angiogenesis	28	5,02	3,00	-0,40	0,88
Angiotensin II-stimulated signaling through G proteins and beta-arrestin	15	2,69	3,00	0,12	0,50
Apoptosis signaling pathway	25	4,48	3,00	-0,33	0,83
Asparagine and aspartate biosynthesis	2	0,36	2,00	4,58	0,05
ATP synthesis	5	0,90	1,00	0,12	0,59
Axon guidance mediated by netrin	7	1,26	2,00	0,59	0,36
Axon guidance mediated by semaphorins	8	1,43	1,00	-0,30	0,76
Axon guidance mediated by Slit/Robo	8	1,43	1,00	-0,30	0,76
B cell activation	16	2,87	3,00	0,05	0,55
Blood coagulation	16	2,87	10,00	2,48	0,00
Cadherin signaling pathway	19	3,41	2,00	-0,41	0,86
Cytoskeletal regulation by Rho GTPase	50	8,97	7,00	-0,22	0,79
De novo purine biosynthesis	12	2,15	1,00	-0,54	0,88
Dopamine receptor mediated signaling pathway	25	4,48	1,00	-0,78	0,99
EGF receptor signaling pathway	35	6,28	8,00	0,27	0,29
Endothelin signaling pathway	16	2,87	2,00	-0,30	0,78
FAS signaling pathway	9	1,61	3,00	0,86	0,22
FGF signaling pathway	31	5,56	9,00	0,62	0,11
Fructose galactose metabolism	4	0,72	1,00	0,39	0,51
Glutamine glutamate conversion	3	0,54	1,00	0,86	0,42
Glycolysis	17	3,05	5,00	0,64	0,19
Gonadotropin releasing hormone receptor pathway	55	9,87	6,00	-0,39	0,93
Heterotrimeric G-protein signaling pathway-Gi alpha and Gs alpha mediated pathw	27	4,84	3,00	-0,38	0,86
Heterotrimeric G-protein signaling pathway-Gq alpha and Go alpha mediated pathw	21	3,77	2,00	-0,47	0,89
Heterotrimeric G-protein signaling pathway-rod outer segment phototransduction	10	1,79	1,00	-0,44	0,83
Huntington disease	59	10,58	9,00	-0,15	0,73
Inflammation mediated by chemokine and cytokine signaling pathway	74	13,27	12,00	-0,10	0,68
Insulin/IGF pathway-mitogen activated protein kinase kinase/MAP kinase cascade	9	1,61	1,00	-0,38	0,80
Integrin signalling pathway	84	15,07	16,00	0,06	0,44
Interferon-gamma signaling pathway	3	0,54	1,00	0,86	0,42
Interleukin signaling pathway	13	2,33	2,00	-0,14	0,68
N-acetylglucosamine metabolism	2	0,36	1,00	1,79	0,30
Nicotine pharmacodynamics pathway	14	2,51	1,00	-0,60	0,92
Nicotinic acetylcholine receptor signaling pathway	36	6,46	1,00	-0,85	1,00
p38 MAPK pathway	9	1,61	2,00	0,24	0,48
p53 pathway	15	2,69	1,00	-0,63	0,93
Parkinson disease	36	6,46	18,00	1,79	0,00
PDGF signaling pathway	18	3,23	1,00	-0,69	0,96
Pentose phosphate pathway	5	0,90	2,00	1,23	0,23
Phenylalanine biosynthesis	2	0,36	2,00	4,58	0,05
PI3 kinase pathway	14	2,51	1,00	-0,60	0,92
Plasminogen activating cascade	8	1,43	4,00	1,79	0,06
Purine metabolism	1	0,18	2,00	10,15	0,01
Pyridoxal phosphate salvage pathway	1	0,18	1,00	4,58	0,16

Pyrimidine Metabolism	6	1,08	1,00	-0,07	0,66
Pyruvate metabolism	7	1,26	3,00	1,39	0,13
Ras Pathway	20	3,59	3,00	-0,16	0,70
Salvage pyrimidine deoxyribonucleotides	2	0,36	1,00	1,79	0,30
Salvage pyrimidine ribonucleotides	6	1,08	2,00	0,86	0,29
Synaptic vesicle trafficking	8	1,43	1,00	-0,30	0,76
T cell activation	20	3,59	5,00	0,39	0,29
TCA cycle	6	1,08	2,00	0,86	0,29
TGF-beta signaling pathway	9	1,61	2,00	0,24	0,48
Toll receptor signaling pathway	10	1,79	3,00	0,67	0,27
Tyrosine biosynthesis	2	0,36	2,00	4,58	0,05
Ubiquitin proteasome pathway	24	4,30	4,00	-0,07	0,62
Vasopressin synthesis	5	0,90	2,00	1,23	0,23
VEGF signaling pathway	12	2,15	2,00	-0,07	0,63
Vitamin B6 metabolism	1	0,18	1,00	4,58	0,16
Wnt signaling pathway	41	7,35	2,00	-0,73	0,99
Xanthine and guanine salvage pathway	2	0,36	2,00	4,58	0,05

Total Oraloma normal	2336
Total Diabetes	419

Devido ao nº elevado de Pathways relativo ao OralOma Normal (125) , apresentei apenas os comuns com a Diabetes

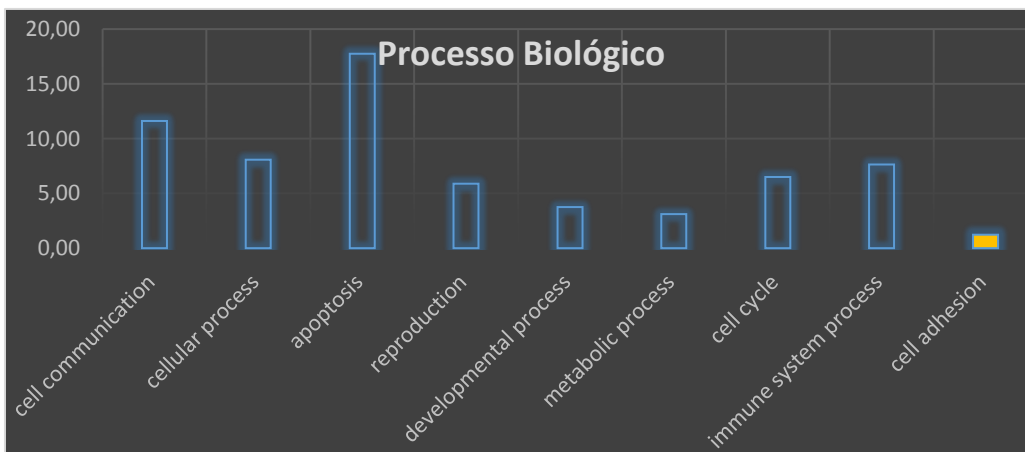
* Log of fractional difference (observed vs expected) is calculated for each testing list as: $(\# \text{ genes for the category} - \# \text{ genes expected}) / \# \text{ genes expected}$



5-Hydroxytryptamine d
Alzheimer disease-presenil
Apoptosis signalir
Axon guidance mediate
B cell
Cytoskeletal regulation by F
EGF receptor signalir
FGF signalir
Interferon-gamma signalir
Nicotine pharmacodynami
pE
Pentose phospho
Plasminogen activati
Pyrimidine N
Salvage pyrimidine deoxyribon
T cell
Toll receptor signalir
Vasopressi
Wnt signalir

Biological Process	DMT2	DMT1 esperado	DMT1 observado	Diferença fraccional	P value
cell communication	85	1,031	13	11,61	0,00
cellular process	118	1,431	13	8,08	0,04
apoptosis	22	0,267	5	17,74	0,02
reproduction	12	0,146	1	5,87	0,57
developmental process	52	0,631	3	3,76	0,72
metabolic process	221	2,680	11	3,10	0,96
cell cycle	33	0,400	3	6,50	0,40
immune system process	105	1,274	11	7,64	0,09
cell adhesion	37	0,449	1	1,23	0,93
response to stimulus	72	0,873	8	8,16	0,11
Total Oraloma normal	419				
Total Diabetes 1	29				

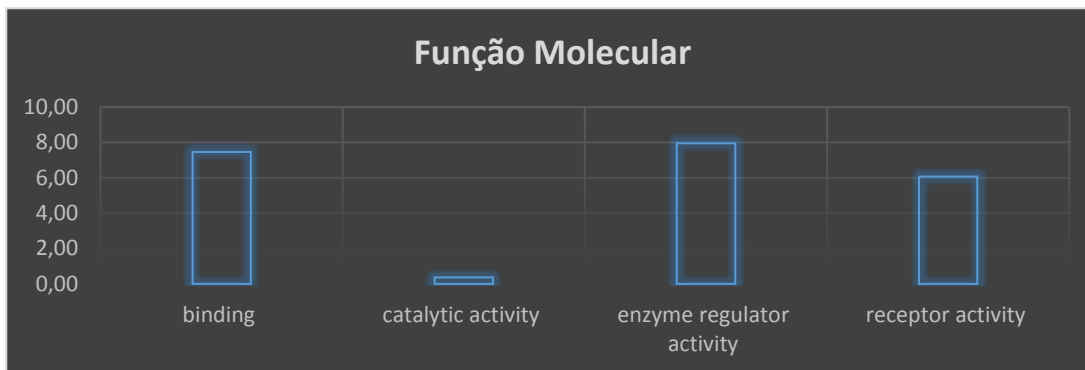
* Log of fractional difference (observed vs expected) is calculated for each testing list as: $(\# \text{ genes for the category} - \# \text{ genes expected}) / \# \text{ genes expected}$



Função Molecular	DMT2	DMT1 esperado	DMT1 observado	Diferença fracional	p-value
binding	146	1,7708072	15	7,47	0,05
catalytic activity	182	2,2074446	3	0,36	1,00
enzyme regulator activity	46	0,5579256	5	7,96	0,21
receptor activity	35	0,4245086	3	6,07	0,44

419

29

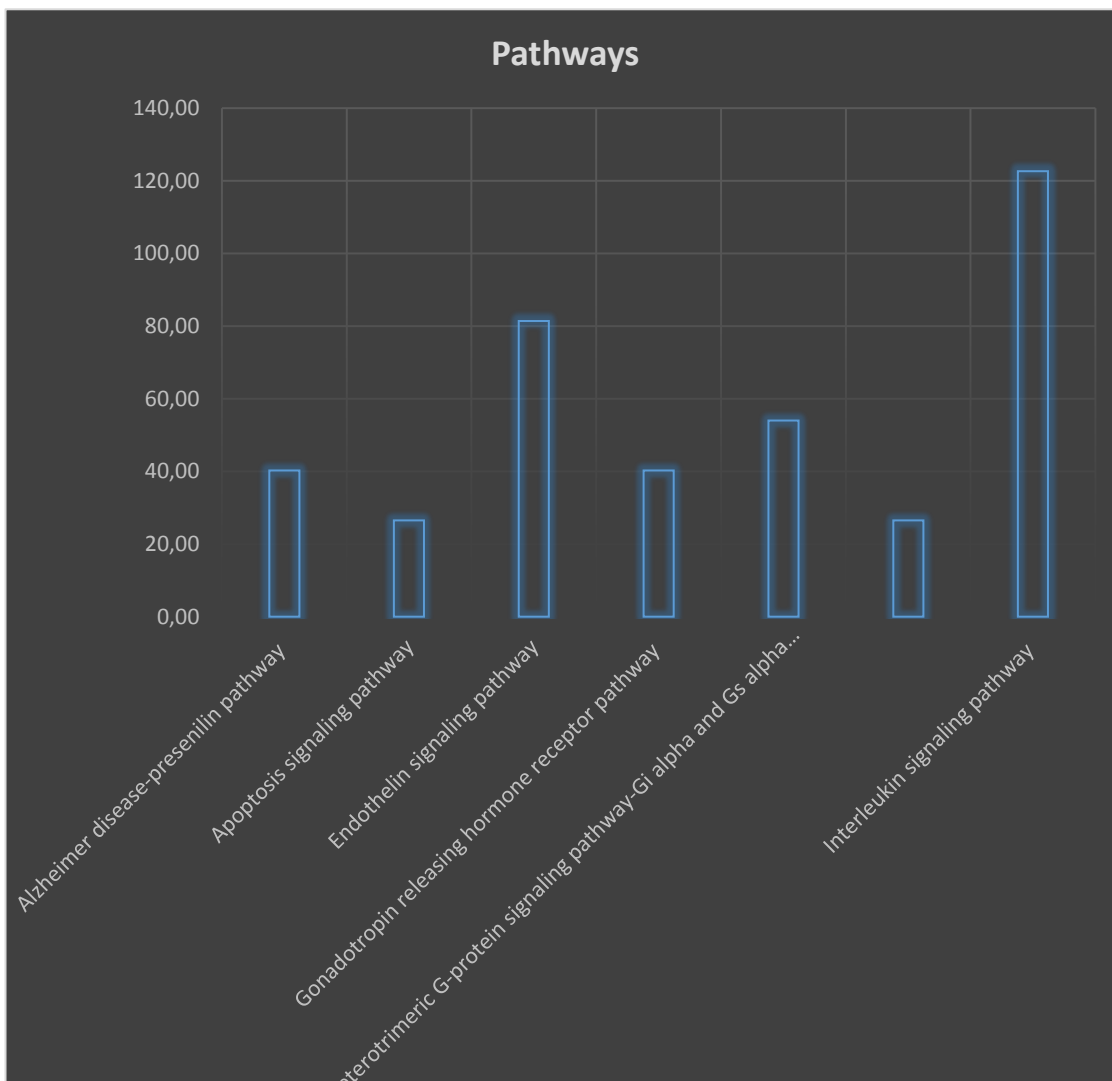


* Log of fractional difference (observed vs expected) is calculated for each testing list as: $(\# \text{ genes for the category} - \# \text{ genes expected}) / \# \text{ genes expected}$

Pathway	DMT2	DMT1 esperado
Alzheimer disease-presenilin pathway	4	0,05
Apoptosis signaling pathway	3	0,04
Endothelin signaling pathway	2	0,02
Gonadotropin releasing hormone receptor pathway	6	0,07
Heterotrimeric G-protein signaling pathway-Gi alpha and Gs alpha mediated p	3	0,04
Inflammation mediated by chemokine and cytokine signaling pathway	12	0,15
Interleukin signaling pathway	2	0,02
Interferon-gamma signaling pathway	1	0,01
Wnt signaling pathway	2	0,02
	419	
	29	

Devido ao nº elevado de Pathways relativo ao OralOma Normal (125) , apresentei apenas os comuns com a Diabetes

* Log of fractional difference (observed vs expected) is calculated for each testing list as: $(\# \text{ genes for the category} - \# \text{ genes expected}) / \# \text{ genes expected}$



DMT1 observado	Diferença fracional
----------------	---------------------

2	40,22	0,03
1	26,48	0,19
2	81,45	0,01
3	40,22	0,01
2	53,97	0,02
4	26,48	0,01
3	122,67	0,00
1	81,45	0,07
1	40,22	0,13