



UNIVERSIDADE  
CATÓLICA PORTUGUESA | INSTITUTO DE  
CIÊNCIAS DA SAÚDE

SALIVA: IDENTIFICAÇÃO DE VARIÁVEIS  
FUNDAMENTAIS PARA A RECOLHA DE  
AMOSTRAS DE UM BIOBANCO

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

Por  
Graciela Sofia Carvalho Santos

Viseu, 2014





UNIVERSIDADE  
**CATÓLICA** | INSTITUTO DE  
PORTUGUESA | CIÊNCIAS DA SAÚDE

**SALIVA: IDENTIFICAÇÃO DE VARIÁVEIS  
FUNDAMENTAIS PARA A RECOLHA DE  
AMOSTRAS DE UM BIOBANCO**

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

Por  
Graciela Sofia Carvalho Santos

**Orientador:** Mestre Nélio Veiga  
**Coorientadora:** Professora Doutora Maria José Correia

Viseu, 2014



## **Dedicatória**

Ao meu avô, **Nelso**, apesar de já não estar fisicamente presente entre nós obrigado por tudo, por estar sempre presente, pelo seu amor e carinho. Foi e sempre será um exemplo de força, luta e coragem, só Deus sabe como Te Amo e como me fazes falta.

Aos meus avós, **Nelso e Maria do Céu**, agradeço por me educarem, por me ensinarem o sentido da responsabilidade e a transmissão de valores pelos quais dirijo a minha vida.

Aos meus pais, **José e Edite**, agradeço o seu amor, o seu apoio incondicional e incentivo ao longo destes 5 anos e de toda a minha vida.

Um muito obrigado

Ao meu namorado, **Paulo**, pelo amor, carinho e companheirismo, e pela paciência nos momentos de insegurança.



## Agradecimentos

Um muito obrigado ao **Mestre Nélio Veiga**, orientador deste projeto, pela orientação e apoio prestado na realização deste trabalho, pela palavra amiga nos momentos mais difíceis, pela simpatia, amizade e profissionalismo ao longo destes meses de trabalho.

À **Professora Doutora Maria José Correia**, coorientadora deste projeto, pela disponibilidade, sabedoria, rigor, correção científica e conhecimentos prestados durante a elaboração deste projeto.

À minha amiga e trinómia, **Mafalda Dinis**, obrigado por me resgatares do abismo nos momentos mais complicados, por teres o dom de me fazer sorrir mesmo quando a vida não me levava a fazê-lo. Obrigada pela amizade, pelo apoio, pela partilha de momentos, pela presença, física ou não, mas incondicional... foste uma colega excepcional e uma amiga importantíssima que vou recordar para sempre. Não tenho dúvida que fui uma pessoa mais feliz por te ter conhecido e por ter partilhado este longo percurso contigo.

À minha amiga, **Veronique Gomes**, pela pessoa maravilhosa que é. Contigo partilhei momentos de alegria e tristeza! Obrigado pelas tuas palavras amigas e pela tua presença nos momentos mais difíceis. Hoje e sempre vais ter um lugar no meu coração.

À **Universidade Católica Portuguesa** a todos os professores, funcionários e pacientes pela dedicação e pelos conhecimentos transmitidos, um muito obrigado.



**“O valor das coisas não está no tempo em que elas duram,  
mas na intensidade com que acontecem. Por isso existem  
momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas  
incomparáveis.”**

**Fernando Pessoa**



## Resumo

**Introdução:** Os biobancos ao conservarem coleções de amostras e dados armazenados de forma organizada apresentam-se essenciais. A saliva contém uma abundância de proteínas e moléculas de ácido nucleico, que refletem o estado fisiológico do indivíduo. O diagnóstico salivar oferece uma abordagem fácil, barata, segura e não-invasiva para a detecção da doença.

**Objetivos:** Este estudo divide-se em duas partes: 1) elaboração de um questionário com as principais variáveis relevantes que devem estar presentes num estudo de epidemiologia oral aquando da recolha de saliva juntamente com um consentimento informado; 2) elaboração e aplicação de um questionário de avaliação para os investigadores com publicações que usem saliva como amostra biológica avaliando a adequação da quantidade e qualidade dos dados recolhidos.

**Métodos:** Foi criado um questionário com as variáveis que devem estar presentes aquando da recolha da saliva, sendo a população-alvo os dadores de amostras biológicas que venham a contribuir para o biobanco. Numa segunda fase foi realizado um estudo epidemiológico observacional transversal. A recolha de dados foi realizada numa amostra final de 29 elementos que cumpriram os critérios de inclusão através da resposta a um questionário aplicado a investigadores que usam saliva como amostra biológica.

**Resultados:** O questionário referente à recolha da saliva foi dividido em 5 grupos, sendo no total constituído por 51 perguntas. O questionário aplicado aos investigadores continha 4 perguntas de modo a avaliar o questionário da recolha. Às perguntas 1, 2, 3 e 4, responderam que sim respetivamente 58,6%, 93,1%, 96,6% e 72,4%. Sendo que a maior percentagem de não concordância foi na pergunta 1, com 41,4%. O questionário incluía ainda 3 questões de resposta aberta, todas as sugestões dadas foram registadas e analisadas.

**Discussão/Conclusão:** A existência de amostras biológicas juntamente com a informação clínica do dador representa um recurso fundamental em investigação. De acordo com alguns investigadores um biobanco com as informações presentes no questionário associadas, seria muito valioso.

**Palavras-chave:** Biobanco de saliva; Amostra biológica; Dadores; Consentimento informado; Questionário.



## **Abstract**

**Introduction:** Biobanks are essential to preserve collections of samples and data in an organized manner. Saliva contains an abundant amount of proteins and nucleic acid molecules that reflect the physiological state of an individual. Salivary diagnosis is an easy, cheap, secure and non-intrusive approach to identify a disease.

**Aims:** The present survey is divided into two sections: 1) the preparation of a questionnaire involving the main relevant variables that must be taken into account when conducting an oral epidemiological study involving saliva data collection and also an informed consent; 2) the preparation and application of an evaluation questionnaire for the researchers who have published research using saliva as a biological sample.

**Methodology:** A questionnaire to be applied at saliva collection was created. In a second stage, an epidemiological observational cross-sectional study was performed by applying an evaluation questionnaire to researchers with published studies using saliva samples. Data collection resulted in a final sample of 29 elements that fulfilled the inclusion criteria by answering the questionnaire.

**Results:** The questionnaire related to saliva collection was divided into 5 groups, in a total of 51 questions. The questionnaire applied to saliva researchers was constituted by 4 questions that assessing the previous questionnaire. Questions 1, 2, 3 and 4, were responded by 58.6%, 93.1%, 96.6% and 72.4% of participants. The highest percentage of dissent was identified in question 1, presenting 41.4%. The questionnaire also contained 3 open-answer questions and all the suggestions were registered and analysed.

**Discussion/Conclusion:** The existence of biological samples, combined with the clinical information of the donor, constitutes a fundamental resource for research. According to some researchers, a biobank with saliva samples complemented by the information present in the questionnaire would be extremely useful.

**Key-words:** Saliva Biobank; Biological Sample; Donors; Informed Consent; Questionnaire.



# Índice

Índice de Tabelas .....	XIX
Lista de siglas .....	XXI
I. Introdução.....	3
II. Revisão da Literatura .....	7
2.1 Biobanco de amostras biológicas humanas.....	7
2.2 Tipos de biobancos .....	7
2.2.1 Biobancos populacionais.....	8
2.2.2 Biobancos clínicos.....	10
2.3 Princípios para o desenho e implementação dos biobancos .....	14
2.3.1 Conceber e validar o protocolo da colheita das amostras antes de iniciar a respetiva colheita.....	14
2.3.2 Colheita de amostras tendo em vista o futuro .....	15
2.3.3 Implementar programas de qualidade desde o início do estudo.....	15
2.3.4 Centralização e uniformização da variabilidade .....	15
2.4 Redes internacionais de biobancos .....	15
2.5 Biobancos de saliva .....	17
2.6 Boas práticas e diretivas de organização dos biobancos.....	19
2.6.1 Aspetos ético-legais.....	20
2.6.2 Consentimento informado .....	20
2.6.3 Privacidade e identidade das amostras .....	23
2.6.4 Divulgação dos resultados para os participantes.....	23
2.6.4.1 Argumentos contra a divulgação dos resultados .....	24
2.6.4.2 Argumentos a favor da divulgação dos resultados .....	24
2.6.5 Envolvimento público e confiança.....	25
2.6.6 Envolvimento de menores e doentes incapacitados nos biobancos .....	26
2.6.7 Comercialização .....	27
2.6.8 Troca de informação.....	27
2.6.9 Partilha de benefícios .....	28
2.6.10 Proprietários das amostras.....	28

2.6.11 Infra-estruturas e instalações .....	29
2.6.12 Sistemas de informação.....	29
2.6.13 Procedimentos operacionais padrão (POPs) .....	31
2.6.13.1 POPs – Colheita.....	32
2.6.13.2 POPs – Transporte .....	33
2.6.13.3 POPs – Receção, processamento e armazenamento.....	35
2.6.13.4 POPs – Controlo de qualidade.....	35
2.6.13.5 POPs – Utilização e destruição das amostras .....	37
III. Objetivos.....	41
3.1 Questão Orientadora .....	41
3.2 Objetivos .....	41
IV. Materiais e métodos.....	45
4.1 Elaboração de um questionário, folha informativa/ consentimento para a recolha da saliva. ....	45
4.2 Avaliação da utilidade da informação recolhida com o questionário para os investigadores. ....	46
4.2.1 Caracterização do estudo.....	46
4.2.2 População alvo .....	46
4.2.3 Amostra .....	46
4.2.4 Processo de amostragem .....	47
4.2.5 Questionário .....	47
4.2.6 Variáveis em estudo no questionário .....	47
4.3 Instrumentos de colheita e recolha de dados .....	48
4.4 Análise Estatística.....	48
V. Resultados.....	51
5.1 Questionário para a recolha da saliva .....	51
5.2 Folha informativa.....	52
5.3 Declaração de consentimento informado.....	54
5.4 Questionário para os investigadores .....	55
5.5 <i>E-mail</i> dirigido aos investigadores .....	55
5.6 Caracterização das respostas.....	56

5.7 Sugestões – Pergunta 1 – Parte I.....	56
5.8 Sugestões – Pergunta 1 – Parte II .....	57
5.9 Sugestões – Pergunta 1 – Parte III.....	58
5.10 Sugestões – Pergunta 1 – Parte IV.....	58
5.11 Sugestões – Pergunta 1 – Parte V .....	59
5.12 Sugestões – Extra.....	59
5.13 Sugestões – Pergunta 2 .....	60
5.14 Sugestões – Pergunta 3 .....	60
5.15 Sugestões – Pergunta 4 .....	61
VI. Discussão.....	65
6.1 Discussão do questionário para a recolha de saliva.....	65
6.1.1 Grupo I.....	65
6.1.2 Grupo II.....	65
6.1.3 Grupo III.....	68
6.1.4 Grupo IV .....	69
6.1.5 Grupo V.....	70
6.2 Discussão das respostas obtidas dos investigadores .....	70
6.2.1 Pergunta nº1 .....	70
6.2.2 Pergunta nº2 .....	72
6.2.3 Pergunta nº3 .....	72
6.2.4 Pergunta nº4 .....	73
VII. Conclusão.....	77
7.1Conclusões gerais .....	77
7.2 Limitações.....	77
7.3 Aplicações/ Sugestões.....	78
VIII. Bibliografia.....	81
IX. Apêndices .....	93



## Índice de Tabelas

Tabela 1 – Caracterização das respostas.....	56
Tabela 2 – Sugestões – Pergunta 1 – Parte I .....	56
Tabela 3 – Sugestões – Pergunta 1 – Parte II .....	57
Tabela 4 – Sugestões – Pergunta 1 – Parte III.....	58
Tabela 5 – Sugestões – Pergunta 1 – Parte IV.....	58
Tabela 6 – Sugestões – Pergunta 1 – Parte V .....	59
Tabela 7 – Sugestões – Extra.....	59
Tabela 8 – Sugestões – Pergunta 2 .....	60
Tabela 9 – Sugestões – Pergunta 3 .....	60
Tabela 10 – Sugestões – Pergunta 4 .....	61



## Lista de siglas

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico

**BBMRI:** *Biobanking and Biomolecular Resources Research Infrastructure* (Infraestrutura de Investigação de Recursos Biomoleculares e de Bancos de Recursos Biológicos)

**GraPH-Int:** *The Genome-based Research and Population Health International Network* (Investigação baseada no Genoma e Rede Internacional de Saúde Pública)

**HuGE-Net:** *Human Genome Epidemiology Network* (Rede de Epidemiologia do Genoma Humano)

**IATA:** *International Air Transport Association* (Organização Internacional de Transporte Aéreo)

**ICAO:** *International Civil Aviation Organization* (Organização Internacional de Aviação Civil)

**IBBL:** Integrated BioBank Luxembourg (Biobanco Integrado do Luxemburgo)

**ISBER:** *International Society for Biological and Environmental Repositories* (Sociedade Internacional para Repositórios Biológicos e Ambientais)

**IMM:** Instituto de Medicina Molecular

**LIMS:** *Laboratory Information Management Systems* (Sistemas de Gestão da Informação laboratorial)

**MRC:** *Medical Research Council* (Conselho de Investigação Médica)

**NCI:** *National Cancer Institute* (Instituto Nacional de Cancro)

**OECD:** *Organisation for Economic Cooperation and Development* (Organização para a Economia, Cooperação e Desenvolvimento)

**PHG:** *Public Health Genetics/Genomics* (Genética e Genómica de Saúde Pública)

**P3G:** *Public Population Project in Genomics* (Rede Internacional para Estudos de Genómica Populacional)

**POPs:** Procedimentos Operacionais Padrão

**UK:** Reino Unido

**SEEBMO:** Serviço Especializado de Epidemiologia e Biologia Molecular

**TUBAFROST:** *European Human Frozen Tumor Tissue Bank* (Biobanco Europeu TUBAFROST de tecidos tumorais humanos congelados)

**ZMF** - Centro de Investigação Médica da Universidade de Graz, Áustria



# *INTRODUÇÃO*



## I. Introdução

Os biobancos apresentam-se como um recurso fundamental ao desvendar a associação entre a predisposição genética, estilo de vida, determinantes ambientais, resposta ao tratamento a variadas doenças e traços de saúde <sup>(1)</sup>. *Biobanking* é definido como a recolha, armazenamento, processamento e distribuição de material biológico humano e dados fenotípicos entre os vários biobancos <sup>(1)</sup>. Segundo Shankar e Uday <sup>(2)</sup>, é construído em quatro etapas diferentes, sendo o primeiro passo a colheita de amostras, o segundo a preservação, o terceiro a etiquetagem e o quarto a disponibilização das amostras já processadas e rotuladas aos investigadores. Os biobancos variam desde biobancos clínicos focados em determinadas doenças, biobancos populacionais e biobancos associados a pequenos e grandes estudos de investigação <sup>(2)</sup>. Variam também em relação à finalidade para que recolheram uma amostra, fins clínicos, investigação ou judiciais <sup>(3)</sup>.

Quatro áreas chave devem ser abordadas na conceção e implementação dos biobancos, independentemente do seu tamanho e uso, entre elas conceber e validar o protocolo da colheita das amostras antes de iniciar a respetiva colheita, efetuar a colheita das amostras tendo em vista o futuro, implementar programas de qualidade desde o início do estudo e centralizar e uniformizar a variabilidade entre os diversos biobancos <sup>(4)</sup>.

Relativamente às redes internacionais de biobancos existe um reconhecimento crescente que uma estratégia comum é imperativo para desenvolver globalmente os biobancos de uma forma mais eficaz <sup>(5)</sup>. Sendo prioridades estratégicas a harmonização internacional para aumentar a interoperabilidade e a sustentabilidade, devendo a cooperação e colaboração estender para além da permissão do intercâmbio de dados e amostras entre as diferentes organizações <sup>(4)</sup>.

Deparamo-nos com vários temas debatidos na participação nos biobancos, como o consentimento informado <sup>(6,7)</sup>, os aspetos ético-legais, a privacidade e identidade das amostras <sup>(8)</sup> e a proteção da identidade dos dadores, a divulgação dos resultados para os participantes <sup>(5, 8)</sup>, o envolvimento público e confiança, o envolvimento de menores e incapacitados em investigação, a comercialização, troca de informação, partilha de benefícios <sup>(6)</sup>, entre outros.

A saliva apresenta várias potencialidades que contribuem para o conhecimento da biologia oral e para o diagnóstico da patologia oral. Uma das principais razões para a

inclusão da saliva neste biobanco é o reconhecimento da sua utilidade, a sua recolha e armazenamento constitui um elemento chave na utilização deste fluido biológico para efeitos de diagnóstico. O interesse da saliva como fluido de diagnóstico avançou exponencialmente nos últimos anos apresentando potencial para se tornar uma amostra de primeira escolha. Apresenta diversas vantagens como a sua forma de recolha, o processo de doação e o seu custo. Sendo eficaz na triagem de grandes populações. Apresenta um risco mínimo de contração de infeção durante a recolha, e pode ser usada em situações desafiadoras como a obtenção de amostras de crianças ou pacientes com deficiência ou ansiosos, nos quais a colheita de sangue poderia ser um ato difícil de realizar. Apresenta como desvantagem a sua composição salivar que pode ser influenciada pelo método de recolha e pelo grau de estimulação do fluxo salivar. Pelo que o protocolo da colheita de saliva deve apresentar um elevado rigor.

O presente trabalho estrutura-se num primeiro capítulo a introdução, o segundo capítulo apresenta uma revisão da literatura das temáticas envolvidas no estudo, nomeadamente na constituição e finalidade dos biobancos assim como os dados associados aos mesmos. O capítulo três refere-se aos objetivos do estudo. Seguidamente o capítulo quatro refere-se à metodologia utilizada na recolha e análise dos dados, sendo que numa primeira fase foi elaborado um questionário com as principais variáveis relevantes que devem estar presentes num estudo de epidemiologia oral aquando da recolha de saliva e um consentimento informado para potenciais dadores de amostras. Numa segunda fase foi desenhado um questionário de avaliação aplicado a investigadores com publicações que usem saliva como amostra biológica avaliando deste modo a adequação da quantidade e qualidade dos dados recolhidos no questionário que deve acompanhar a recolha de saliva. O capítulo cinco remete para os resultados obtidos seguidos de uma discussão dos mesmos no capítulo seis. Por fim o capítulo sete apresenta as conclusões do estudo assim como as limitações encontradas na sua realização.

# *REVISÃO DA LITERATURA*



## II. Revisão da Literatura

### 2.1 Biobanco de amostras biológicas humanas

Um banco de produtos biológicos consiste em “qualquer repositório de amostras biológicas ou seus derivados, com ou sem tempo delimitado de armazenamento, quer utilize colheita prospectiva ou material previamente colhido, quer tenha sido obtido como componente da prestação de cuidados de saúde de rotina, quer em programas de rastreio, como em investigação, e que inclua amostras que sejam identificadas, identificáveis, anonimizadas ou anónimas.” (Lei nº12/2005, artº 19, nº1)<sup>(1)</sup>.

De acordo com Zielhuis <sup>(2)</sup> *biobanking* é definida como a recolha, armazenamento, processamento e distribuição de material biológico humano e dados fenotípicos em biobancos. Os biobancos são um recurso fundamental para desvendar a associação entre a herança genética, estilo de vida, determinantes ambientais, resposta ao tratamento a variadas doenças e traços de saúde <sup>(2)</sup>. *Biobanking* tem contribuído para o tratamento e compreensão de variadas doenças.

Segundo Shankar e Uday <sup>(3)</sup>, é composto por quatro etapas diferentes, sendo o primeiro passo a colheita de amostras. Estas amostras são normalmente obtidas durante as visitas clínicas, procedimentos terapêuticos ou de diagnóstico, ou pós-morte na autópsia. O segundo passo corresponde à preservação destas amostras, sendo preservadas pela fixação e congelamento. O terceiro passo é a etiquetagem que faz a ligação entre os dados de saúde associados ao paciente com o seu tratamento e evolução, assim como a composição das amostras. Sendo o quarto e último passo a disponibilização das amostras já processadas e rotuladas aos investigadores por um processo sistemático.

### 2.2 Tipos de biobancos

Os biobancos variam em *design* ou propósito, desde pequenas instituições a laboratórios de investigação, sendo em alguns países de grande escala. Variam de país para país e variam entre aqueles destinados a cuidados de saúde (biobancos clínicos) e outros destinados a apoiar principalmente investigações. Os biobancos de investigação podem variar desde biobancos focados em determinadas doenças, a biobancos populacionais e a biobancos associados a pequenos e grandes estudos de investigação <sup>(3)</sup>. Os biobancos variam também em relação à finalidade para que recolheram uma amostra, fins clínicos

(transfusões de sangue, transplantes, diagnósticos genéticos), investigação (doenças neurodegenerativas, populações isoladas, estudos de farmacogenética) ou judiciais <sup>(4)</sup>.

Os biobancos podem assumir variadas classificações consoante os autores, Harris *et al.*, <sup>(5)</sup> atribui 4 classificações: 1) amostras residuais recolhidas durante o atendimento clínico de rotina para fins terapêuticos ou de diagnóstico (inclui amostras de tumores, dados demográficos, clínicos e resultados); 2) amostras colhidas durante ensaios clínicos; 3) amostras colhidas como parte de projetos específicos; 4) amostras colhidas como parte de biobancos de base populacional (incluindo muitas vezes componentes longitudinais). Por outro lado Zielhuis <sup>(2)</sup>, simplifica a classificação, distinguindo apenas dois tipos de biobancos: biobancos populacionais e biobancos clínicos.

Já Budimir *et al.*, <sup>(6)</sup> refere também que as amostras colhidas podem ser de base populacional ou específica da doença, sendo provenientes de uma diversidade de indivíduos desde menores a adultos. Os biobancos podem conter amostras humanas anónimas ou amostras ligadas à informação pessoal específica. Apresentando deste modo várias finalidades como o diagnóstico, fins terapêuticos ou de investigação.

Os biobancos podem ser uma propriedade pública ou privada, sendo esta última sem fins lucrativos ou com fins lucrativos. Face à diversidade existente está associado um amplo espectro de questões éticas e legais.

### 2.2.1 Biobancos populacionais

O objetivo principal da investigação nos biobancos de base populacional consiste em descobrir biomarcadores para a suscetibilidade à doença dentro da população em causa, não possuindo uma base a nível hospitalar.

De acordo com Kelley *et al.*, <sup>(7)</sup> um biobanco de base populacional é definido como um grande depósito de ADN humano doado e / ou a sua informação, recolhida a partir de voluntários saudáveis, que são representativos de uma região, país ou grupo étnico.

Os dados que acompanham a amostra doada compreendem não só a história médica, mas também medidas físicas e de informação epidemiológica (por exemplo: hábitos de vida, status socioeconómico). A Europa contempla diversos estudos epidemiológicos realizados, fazendo-se estes acompanhar de amostras biológicas. Face à diversidade da população Europeia estes estudos representam um recurso benéfico nas estratégias de investigação como o diagnóstico, ou o fim terapêutico <sup>(24)</sup>.

Calcula-se que no final de 2007 existiam cerca de 120 biobancos populacionais. Estes encontravam-se principalmente na Europa, na América do Norte e na China, sendo que na Europa a maioria encontra-se na Europa Ocidental e Escandinávia <sup>(4)</sup>. Em seguida vão ser descritos como exemplo de biobancos populacionais o biobanco do Reino Unido, da Espanha e da Estónia. Estes biobancos armazenam uma elevada quantidade de amostras e estão a sofrer um rápido desenvolvimento, aumentado de forma acentuada após o sequenciamento do genoma humano, em 2000 <sup>(4)</sup>. Alguns países criaram bancos de ADN na esperança de um conhecimento mais avançado na prevenção das doenças genéticas (Hirtzlin *et al*) <sup>(8)</sup>.

O Biobanco do Reino Unido estabeleceu-se no final da década de 1990 do século XX, foi criado para realizar investigações sobre novos métodos de prevenção, diagnóstico, tratamento de doenças genéticas e estilo de vida. Seis centros regionais trabalham em conjunto juntamente com 22 universidades britânicas. Os participantes são recrutados voluntariamente, doam amostras de sangue, urina e saliva e preenchem um questionário. As amostras adquiridas são mantidas por um período de 20-30 anos e disponibilizadas apenas para investigadores. Os investigadores do exterior também podem solicitar as amostras <sup>(4)</sup>. É permitido ganhar lucros com a investigação (Yuille *et al.*) <sup>(9)</sup>, os resultados dos testes não são disponibilizados aos dadores, mas quando o pretenderem podem retirar os dados do banco de dados.

O Banco Nacional de ADN foi criado em 2004 pela Fundação Espanhola de Genoma em colaboração com a Universidade de Salamanca. O objetivo da sua criação foi apoiar a investigação sobre a diversidade genética da população que vive em Espanha, investigando os determinantes da suscetibilidade a determinadas doenças, novos tratamentos para doenças relacionadas com o estilo de vida, incluindo a investigação farmacogenética <sup>(4)</sup>. Além da sede, desde 2006 o biobanco é composto por quatro institutos em outras províncias de Espanha que se especializam em determinadas doenças. A colheita de amostras é baseada na colaboração com os centros de doação de sangue e os bancos de sangue. Estas instituições são responsáveis pela colheita do sangue e pelo preenchimento de questionários (estes contém perguntas dirigidas ao dador sobre o seu estilo de vida, dieta e história médica familiar). As amostras de ADN são enviadas para a sede em Salamanca, onde são armazenadas. O acesso às amostras está disponível a cientistas Espanhóis e estrangeiros desde que o comité de ética aprove os projetos de investigação. Em 2006, uma rede de centros especializados e redes de investigação em doenças cardiovasculares (Barcelona), metabólicas (Barcelona),

neurofisiátricas (Reus) e oncológicas (Salamanca) foi criado. Estes centros colaboram com outros centros nacionais que realizam investigação no mesmo ramo. Os dadores têm a oportunidade de retirar o seu consentimento e as amostras colhidas pelo biobanco, porém não têm acesso aos resultados dos testes individuais, porque as amostras enviadas para os investigadores são anónimas, os dados pessoais e os dados genéticos do dador são irreversivelmente separados <sup>(4)</sup>.

O biobanco *GenBank* tem como objetivo reunir amostras de aproximadamente um milhão de habitantes da Estónia e da Letónia, foi criado através do projeto Genoma Estónia. Entrou em vigor em 2001, a participação no projeto foi voluntária e os participantes tiveram acesso aos seus resultados (direito de saber) podendo também escolher o direito de não saber. Podiam retirar o consentimento anteriormente concedido e exigir a destruição dos dados que permitissem a sua identificação <sup>(4)</sup>. É supervisionado por um comité de bioética e um comité de supervisão. O financiamento é baseado nos princípios de parceria público-privada. O direito de acesso aos dados é fornecido aos médicos de família e aos investigadores da Estónia. Cada participante assinou um formulário de consentimento informado, doou cerca de 50 ml de sangue e preencheu um questionário que incluía perguntas sobre os seus dados pessoais, condições ambientais, dieta, trabalho, estilo de vida, dados clínicos (por exemplo, doenças anteriores e atuais), e história médica familiar até à terceira geração anterior <sup>(4)</sup>.

### 2.2.2 Biobancos clínicos

Os biobancos de doenças específicas, normalmente têm base hospitalar no qual recolhem amostras que representam uma variedade de doenças, contendo uma coleção muito mais heterogénea de materiais biológicos, tem como alvo os biomarcadores da doença através de colheitas prospetivas e retrospectivas das amostras e seus derivados <sup>(10)</sup>. Segundo Zielhuis os biobancos clínicos focam-se em doenças específicas, possibilitando estudos de caso-controle eficazes como o estudo da interação genes/ambiente, bem como estudos de prognóstico ou seja interação genes/tratamento <sup>(2)</sup>. Serão descritos a nível de exemplos os biobancos da Irlanda, do Luxemburgo, da Áustria e de Lisboa.

O biobanco da Irlanda recolhe e armazena amostras de sangue e tecidos com a finalidade de ajudar na investigação de resultados e tratamentos que possam melhorar os doentes com cancro. As amostras são codificadas de acordo com os princípios de

confidencialidade e privacidade e incluídas nos bancos de dados. Os tecidos são fixados em formol e incluídos em blocos de parafina. As amostras são disponibilizadas para projetos de investigação (universidades, hospitais e empresas farmacêuticas) de forma ética e cientificamente aprovadas. A investigação realizada com amostras de tecidos varia desde os aspetos moleculares básicos envolvidos no cancro até ao desenvolvimento de medicamentos eficazes no tratamento do mesmo. Existem inúmeros biobancos autónomos na Irlanda, na maioria dos casos, não há material suficiente para partilhar ou para grandes estudos translacionais. As principais áreas de estudo exigem colheitas de amostras de grande escala, e a comunidade de investigação da Irlanda é relativamente pequena. Por isso o biobanco da Irlanda está a promover o desenvolvimento de um biobanco de rede hospitalar em toda a ilha da Irlanda como uma ponte entre a investigação e o tratamento do cancro. Esta nova infraestrutura irá facilitar a investigação nacional e internacional, assim como o nível de colaboração na investigação da Irlanda beneficiando deste modo os investigadores que terão acesso *on-line* às amostras e aos dados dos participantes, maximizando os recursos e a experiência. Na rede dos biobancos hospitalares onde se realiza a colheita das amostras são utilizados os mesmos procedimentos e *softwares* de computador dos investigadores. A amostra e os dados dos participantes são inseridos num banco de dados mestre, onde os investigadores através de senhas específicas podem visualizar e aceder através do *site* do Biobanco Irlanda, onde podem consultar os dados clínicos, incluindo o tratamento e o acompanhamento do caso <sup>(8)</sup>.

IBBL (Integrated BioBank Luxemburgo) é uma organização independente sem fins lucrativos com o objetivo de melhorar a saúde do povo do Luxemburgo. Criada em 2008, IBBL desempenha um papel central no desenvolvimento do Luxemburgo com um centro de excelência em investigação biomédica. Faz a colheita, o armazenamento das amostras biológicas e dos seus dados associados, tornando-os disponíveis para as organizações de investigação que estudam as patologias humanas, fornecendo novas tecnologias de investigação. Recolhe amostras biológicas como tecido tumoral, tecido saudável, soro, sangue, urina ou fezes. Todas as amostras recolhidas obedecem ao consentimento informado. Sendo a colheita, o transporte e a preservação das amostras feita com o mais alto padrão de qualidade, empregando patologistas para assegurar o comprimento destes padrões de qualidade. A coleção de amostras é dirigida para apoiar os projetos prioritários no cancro, na diabetes tipo 2 e na doença de Parkinson. Relativamente ao cancro o foco inicial foi o do pulmão em 2008, em 2011 o projeto

expandiu-se para apoiar o cancro da mama e do colo do útero. Sendo o objetivo deste projeto identificar e validar novas ferramentas moleculares que permitam o diagnóstico precoce da doença ou ajudar a proporcionar uma melhor terapia. Na diabetes a equipa da Universidade do Luxemburgo lançou dois estudos que analisam as famílias com diabetes mellitus na tentativa de entender as influências genes/ambiente na predisposição e aparecimento da diabetes. Ao nível da doença de Parkinson o IBBL está a trabalhar em parceria com o Centro de Biomedicina do Luxemburgo e o Centro Hospitalar do Luxemburgo, para identificar novos biomarcadores associados com a doença de Parkinson, com a esperança de melhorar as opções de vida <sup>(8)</sup>.

Outro exemplo é o biobanco clínico da Holanda, este reúne oito hospitais universitários que criaram uma infra-estrutura nacional de investigação para a epidemiologia clínica. Inicialmente esta iniciativa “*String of Pearls*” centrou-se em oito tipos específicos de doenças. Com esforço e apoio a nível nacional estabeleceu-se um grande biobanco clínico corporativo baseado no sangue de dadores no seu curso natural registando os dados resultantes da saúde, da morbilidade e da mortalidade. Sendo depois estes dados fornecidos aos investigadores <sup>(2)</sup>. Em 2004, a Holanda começou a recolha de amostras biológicas em larga escala em várias famílias para estudar os efeitos genéticos sobre a saúde, o estilo de vida e a personalidade <sup>(11)</sup>.

O Biobanco Graz na Áustria possui uma grande coleção de amostras clínicas, um dos maiores na Europa, compreendendo quase seis milhões de amostras, tecidos fixados em formol e incluídos em blocos de parafina, assim como fluidos corporais como o sangue e a criopreservação. Sendo o objetivo deste biobanco entender as interações entre genes/ambiente/estilo de vida, desvendar a base molecular dos subtipos de doenças e permitir que a medicina desenvolva novos biomarcadores, identificar novos alvos para a terapia assim como a descoberta de novos medicamentos. Para ajudar na análise das amostras o Biobanco Graz está ligado a uma alta qualidade de serviços de investigação e tecnologias alojados no Centro de Investigação Médica (ZMF), da Universidade de Graz, sendo uma organização sem fins lucrativos de propriedade pública que é suportada por fundos públicos. Lida com o material biológico disponível, protegendo os direitos pessoais e a privacidade dos dadores da amostra. A colheita de amostras no Biobanco Graz é baseada numa dupla estratégia processada no Hospital Universitário Graz, as amostras dos pacientes e dadores selecionados que concordaram e assinaram um termo de consentimento informado são depositadas no Biobanco Graz. O Biobanco Graz fornece a logística e a infra-estrutura ideal para as equipas de investigação da

Universidade de Medicina de Graz na recolha, processamento e armazenamento das amostras biológicas e dos dados associados. A coleção das diversas amostras fornece a base ideal para a realização de estudos epidemiológicos bem como permite aos cientistas validar biomarcadores na identificação de uma doença específica e determinar a resposta ao tratamento. O biobanco implementou novos processos de trabalho de modo a ser mais rápido e mais eficiente, como um robô automatizado que identifica e armazena automaticamente as amostras. O biobanco Graz coopera com departamentos, clínicas e institutos do Hospital Universitário de Graz, que assegura a recolha de um grande número de amostras e dados clínicos cientificamente relevantes num alto nível de qualidade. É ativo nas ações destinadas a melhorar as interações entre os biobancos e os cientistas. Coordenação, consolidação e criação de redes nos biobancos europeus para o desenvolvimento adicional da ciência biomédica são pontos centrais <sup>(10)</sup>.

O lançamento oficial do Biobanco-IMM decorreu, no dia 3 de Outubro de 2012, no Auditório do Edifício Egas Moniz da Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa. O Biobanco-IMM é uma estrutura criada pelo IMM que acolhe e armazena uma enorme coleção de amostras biológicas, doadas voluntariamente, com o objetivo de incentivar a investigação biomédica. «O objetivo é criar uma estrutura física onde são guardadas amostras biológicas em condições perfeitas de conservação, durante muitos anos, e ao mesmo tempo a informação clínica dos doentes associados a essas amostras. Esta informação é guardada numa estrutura informática específica que permite a segurança contra qualquer utilização indevida», explicou o Prof. Doutor João Eurico Fonseca, Diretor do Biobanco-IMM.

Atualmente contém milhares de amostras biológicas humanas, desde sangue, soro, saliva, urina, osso, ADN e tecido tumoral, e respetiva informação clínica. O biobanco-IMM constitui um importante recurso de apoio à investigação da origem e progressão das doenças com alto impacto na saúde dos cidadãos, como o cancro ou a osteoporose. A riqueza de uma estrutura como o Biobanco-IMM depende da diversidade e da qualidade das amostras biológicas que armazena e disponibiliza à comunidade científica. A existência de amostras tanto de dadores saudáveis como de doentes, a presença de mais do que uma amostra do mesmo dador e a disponibilização de informação clínica dos dadores, representa um recurso fundamental na identificação de novos testes de diagnóstico e prognóstico, bem como de medicamentos inovadores. O Biobanco-IMM disponibiliza ainda diversos tipos de amostras de um único indivíduo, o que é essencial em determinadas investigações biomédicas. As amostras recolhidas pelo

Biobanco-IMM são criopreservadas (guardadas a temperaturas de -80°C e/ou -196°C) e guardadas por um período de tempo superior a 10 anos, protegidas através de um sistema de segurança 24h, sujeito a rigorosas normas de acesso. O biorepositório consiste no armazenamento a -80°C, tanques de azoto líquido, base de dados, e em amostras duplamente codificadas.

O Biobanco-IMM está dotado do atual *software* de gestão de amostras e de informação clínica, assegurando uma gestão rigorosa e cautelosa das mesmas. No incentivo à investigação biomédica, o Biobanco-IMM garante uma utilização rigorosa e cientificamente pertinente das amostras que constituem a sua coleção.

A cedência das amostras para investigação faz-se após aprovação do projeto pela Comissão de Ética, que valida o âmbito e a finalidade da investigação científica, e de acordo com a Comissão Científica, garante a utilização mais adequada para cada amostra. O Biobanco-IMM colabora com diversas organizações de saúde e departamentos de investigação biomédica, está integrado na rede europeia de biobancos do BBMRI - *Biobanking and Biomolecular Resources Research Infrastructure* (Infraestrutura de Investigação de Recursos Biomoleculares e Biobancos), o que permite uma maior visibilidade das suas coleções <sup>(4,8)</sup>.

### 2.3 Princípios para o desenho e implementação dos biobancos

Quatro áreas chaves devem ser abordadas na conceção e implementação dos biobancos, independentemente do seu tamanho e uso <sup>(25)</sup>.

#### 2.3.1 Conceber e validar o protocolo da colheita das amostras antes de iniciar a respetiva colheita

Antes da colheita deve-se decidir se as amostras colhidas vão ser processadas o mais rapidamente possível no local da colheita ou se vão ser enviadas para uma instalação de processamento central. A primeira hipótese apresenta a vantagem de se poder capturar os parâmetros que são rapidamente perdidos, evitando assim a sua degradação. A segunda hipótese permite uma abordagem centralizada na manipulação da amostra garantindo assim um melhor controlo de qualidade <sup>(26, 27)</sup>.

### 2.3.2 Colheita de amostras tendo em vista o futuro

Enquanto alguns estudos envolvem questões específicas outros são mais direcionados para o futuro. A recolha e o processamento das amostras a partir de um grande número de voluntários é um processo dispendioso, consumindo muito tempo. Tornando-se importante durante a fase do projeto considerar se a colheita de amostras adicionais terá potencial de produzir dados úteis no futuro <sup>(25)</sup>.

### 2.3.3 Implementar programas de qualidade desde o início do estudo

O protocolo da colheita e processamento das amostras deve ser apoiado por um programa de controlo de qualidade de modo a validar as amostras para fins de investigação. Devendo incluir a garantia de qualidade (prevenção dos erros e variabilidade de ocorrência), assim como os procedimentos de controlo da qualidade <sup>(25)</sup>.

### 2.3.4 Centralização e uniformização da variabilidade

A recolha e o processamento das amostras varia entre os diversos estudos, trazendo a centralização e uniformização benefícios em termos da robustez dos dados, redução dos custos, precisão na manipulação e separação da amostra. Devendo ser evitado o erro sistemático não detetável introduzido pelo processamento variável (normalmente manual). Tendo em conta que estes recursos são estabelecidos para explorar a etiologia das doenças complexas, onde o impacto da exposição a fatores de risco específicos muitas vezes é baixo, este tipo de erro pode levar a resultados enganosos ou mascarar a presença do verdadeiro causador de associações <sup>(25)</sup>.

## 2.4 Redes internacionais de biobancos

Existe um reconhecimento crescente que uma estratégia comum é imperativo para desenvolver globalmente os biobancos de uma forma eficaz <sup>(5)</sup>. Como os estudos realizados em cada biobanco sozinhos geralmente não tem poder estatístico, existe uma necessidade urgente de colaboração entre os diferentes grupos de investigação, realizando esforços combinados para uma maior qualidade ao nível da infra-estrutura do biobanco nas futuras investigações <sup>(2)</sup>. A harmonização internacional para aumentar a interoperabilidade e a sustentabilidade são duas prioridades estratégicas. A cooperação e

colaboração deve-se estender para além da permissão do intercâmbio de dados e amostras entre as diferentes organizações <sup>(5)</sup>. Várias iniciativas recentes, tanto a nível nacional como internacional têm surgido em toda a Europa e no mundo <sup>(2)</sup>. Um exemplo é a rede europeia de biobancos do BBMRI (Infraestrutura de Investigação de Recursos Biomoleculares e Biobancos), uma rede de 250 biobancos estabelecidos em toda a Europa. A BBMRI visa melhorar a interoperabilidade e a acessibilidade entre os diversos biobancos, harmonizando biobancos semelhantes em locais diferentes. Enriquecendo assim o conteúdo informativo, permitindo armazenar as amostras usando uma estrutura ética mais uniforme <sup>(2)</sup>. Os principais componentes da BBMRI incluem coleções completas de amostras biológicas das diferentes populações da Europa ligadas continuamente com informações sobre o estado de saúde, estilo de vida e exposição ambiental <sup>(24)</sup>. Esta rede de investigação pode se tornar a base para uma investigação integrada, levando a uma melhor compreensão dos fatores que afetam as disparidades de saúde na Europa e uma medida mais eficaz para melhorar a saúde da população Europeia <sup>(4)</sup>. Os biobancos associados à infraestrutura devem aderir aos procedimentos padronizados internacionais e ao controlo de qualidade, respeitando os princípios da harmonização <sup>(10)</sup>. Atualmente existem três organizações em Portugal associadas ao BBMRI: o banco de tumores do Hospital de São João do Porto, o Serviço Especializado de Epidemiologia e Biologia Molecular (SEEBMO) com ADN de sangue periférico, o laboratório de glicobiologia do Instituto de Tecnologia Química e Biológica, com plasma e fluido cérebro-espinal de Oeiras.

Para além da BBMRI existem outras iniciativas internacionais na Fundação de Genética e Genómica de Saúde Pública (PHG) que contribuem para melhorias na saúde da população, como:

- A Rede de Epidemiologia do Genoma Humano (HuGE-Net), ciência básica da genómica da saúde pública, preocupada com a compreensão de como a variação genética afeta a distribuição da doença nas populações, ajudando a traduzir os resultados da investigação genética em oportunidades para a medicina preventiva e para a saúde pública. É uma rede voluntária de indivíduos e organizações <sup>(4)</sup>.
- A rede Internacional para Estudos de Genómica Populacional (P<sup>3</sup>G) é uma instituição sem fins lucrativos, que proporciona à comunidade internacional de investigação recursos e ferramentas inovadoras para a investigação na saúde e nas ciências sociais. O objetivo da investigação biomédica é melhorar a saúde dos indivíduos e das populações. Estudar como os genes interagem entre si, o meio ambiente e o estilo de vida são

essenciais para uma melhor compreensão das doenças. P<sup>3</sup>G trabalha com investigadores de todo o mundo para incentivar a colaboração entre investigadores e biobancos, promover a harmonização de dados, otimizar o *design* e os estudos realizados nos biobancos, otimizar o acesso às bases de dados de investigação e a outras infra-estruturas da saúde, e facilitar a transferência de conhecimentos. Todos os recursos como ferramentas, projetos de investigação e publicações são desenvolvidos com a participação da comunidade internacional e destinados a ajudar toda a comunidade biomédica. Entendendo que a partilha de informação leva ao progresso científico, P<sup>3</sup>G faz com que este conhecimento seja disponível gratuitamente para a comunidade científica internacional através do *site* “*Observatory*” da P<sup>3</sup>G, uma base de dados de conhecimento acessível ao público, onde os usuários têm acesso a ferramentas, estudos e outros recursos para otimizar a formulação de políticas e o desenho de biobancos ou facilitar harmonização e colaboração com outros biobancos <sup>(4)</sup>.

-Investigação baseada no Genoma e Rede Internacional de Saúde Pública (GRaPH-Int) é uma colaboração global de indivíduos e organizações com interesse em genómica da saúde pública. Ajuda a transformar conhecimentos e tecnologias em políticas públicas, programas e serviços em benefício da saúde pública. É ao mesmo tempo uma rede e uma empresa com objetivos interdisciplinares que apoiam o diálogo, a investigação, educação e formação, comunicação e engajamento das partes interessadas. Os avanços da genómica têm potencial para ter um impacto positivo sobre a saúde das populações em todos os lugares <sup>(4)</sup>.

## 2.5 Biobancos de saliva

É do conhecimento da comunidade científica as potencialidades que a saliva apresenta em termos dos seus elementos básicos constituintes e da sua contribuição para o conhecimento da biologia oral e diagnóstico da patologia oral <sup>(41,42)</sup>. A recolha e o armazenamento da saliva é um elemento chave na utilização de fluidos biológicos para efeitos de diagnóstico. Uma das principais razões para a inclusão da saliva nestes biobancos é o reconhecimento da sua utilidade, apresentando potencial para se tornar uma amostra de primeira escolha devido aos avanços em tecnologias de deteção, juntamente com combinações de biomoléculas com relevância clínica. O interesse da saliva como fluido de diagnóstico avançou exponencialmente nos últimos 10 anos <sup>(43)</sup>.

A saliva é ligeiramente ácida, contém uma mistura de secreções de várias glândulas salivares <sup>(45,50)</sup>, os diferentes compostos podem fornecer variadas informações de diagnóstico. Apresentando diversas vantagens, recolha de forma não invasiva, o processo de doação é livre de *stress* podendo ser efetuadas várias recolhas sem causar desconforto no dador, e oferece um custo/ abordagem eficaz para a triagem de grandes populações <sup>(44)</sup>. Como a saliva é um fluido fácil de colher, armazenar e transportar, não requer pessoal altamente treinado. Além disso, a saliva é um fluido "em tempo real", porque as glândulas salivares são glândulas exócrinas que produzem proteínas indicativas de saúde do indivíduo e do bem-estar no momento da colheita. Estas características tornam possível monitorar vários biomarcadores em crianças, idosos e em pacientes não cooperativos <sup>(43)</sup>.

Apresenta um risco mínimo de contração de infeção durante a recolha, e pode ser usada em situações desafiadoras como a obtenção de amostras de crianças ou pacientes com deficiência ou ansiosos, nos quais a colheita de sangue poderia ser um ato difícil de realizar <sup>(43)</sup>. Os biobancos de saliva podem deste modo contribuir para o diagnóstico de doenças hereditárias, doenças auto-imunes, doenças malignas e infecciosas e distúrbios endócrinos, bem como na avaliação dos níveis terapêuticos de drogas <sup>(45)</sup>. Algumas doenças sistémicas afetam as glândulas salivares, direta ou indiretamente e podem influenciar a quantidade e composição da saliva. O futuro do diagnóstico baseia-se em combinações de biomarcadores utilizados como ferramentas de rastreio para melhorar o diagnóstico, exatidão e especificidade. Um biomarcador sozinho pode não ser suficiente para permitir que os investigadores definam a patogénese da doença subjacente, porém o uso de combinações de biomarcadores podem fornecer informações poderosas de diagnóstico <sup>(43,45)</sup>.

Como o sangue, a saliva é um líquido complexo contendo uma variedade de enzimas, hormonas, anticorpos, componentes antimicrobianos, e citoquinas <sup>(49,51,52)</sup>. A sua utilização como amostra nos biobancos tem sido dificultada, a falta de compreensão das biomoléculas presentes na saliva e a sua relevância para a etiologia da doença, combinadas com a falta de sistemas de deteção de alta sensibilidade tem aumentado esta dificuldade. Como meio de diagnóstico a saliva também apresenta desvantagens, como a composição salivar que pode ser influenciada pelo método de recolha e pelo grau de estimulação do fluxo salivar <sup>(44,45)</sup>.

Os biomarcadores para o diagnóstico de saliva são diferentes dos biomarcadores séricos convencionais <sup>(48)</sup>. Um dos obstáculos tecnológicos no desenvolvimento da saliva como

fluido de diagnóstico é a baixa concentração de analitos encontrados na saliva 1000 vezes menor em comparação com o sangue <sup>(46)</sup>. Sistemas de detecção específicos são necessários para desvendar e melhorar a utilidade da saliva como fluido de diagnóstico nos biobancos. Como a maioria dos compostos encontrados no sangue também estão presentes na saliva, esta pode refletir o estado fisiológico do corpo, variações endócrinas, emocionais, nutricionais e metabólicas e fornecer uma fonte para o monitoramento da saúde bucal e também sistêmica. Nos biobancos dos países em vias de desenvolvimento e dos países ocidentais, podemos utilizar a saliva como meio de diagnóstico da doença cardiovascular, do cancro da mama, das doenças auto-imunes <sup>(54)</sup>, da doença periodontal <sup>(47)</sup> e do cancro oral <sup>(53)</sup>.

Medidas precisas do fluxo salivar e da composição da saliva são essenciais para muitos estudos clínicos e de diagnóstico. A saliva pode ser recolhida em repouso ou pode ser estimulada <sup>(41)</sup>. Embora seja possível a colheita da saliva específica de uma determinada glândula, estes procedimentos são complexos, lentos e invasivos, exigindo pessoal qualificado <sup>(41)</sup>. A saliva mista é o método mais prático de colheita para estudos de rotina ou de grande amostragem <sup>(49)</sup>.

Em muitos estudos, os participantes foram convidados a cuspir ou a babar <sup>(49)</sup>. Ao cuspir existe um estímulo, produzindo até 1 mL / min, enquanto que na recolha passiva a saliva não é estimulada. Esta recolha tem várias desvantagens, uma das quais é a barreira social existente quando a pessoa cospe, especialmente em pacientes geriátricos. Além disso, a presença de xerostomia agrava a colheita de saliva pelo método da baba passiva, especialmente em pacientes mais velhos. Para aumentar o fluxo salivar, a aplicação de ácido cítrico na língua tem sido usada para induzir secreções máximas de 5-10 ml / min, no entanto tem sido relatado que o uso de ácido cítrico pode diminuir o pH da amostra. Como consequentemente, na maioria dos estudos envolvendo a saliva, esta é recolhida com tecidos absorventes na boca e em seguida, extrai-se por centrifugação <sup>(49)</sup>.

A análise salivar de confiança requer protocolos rígidos de colheita, armazenamento e preparação da amostra, podendo estes variar dependendo dos analitos de interesse <sup>(49)</sup>.

## 2.6 Boas práticas e diretivas de organização dos biobancos

Os biobancos devem adotar e implementar boas práticas, incluindo políticas e procedimentos operacionais padronizados <sup>(32)</sup>. Alguns dos aspetos importantes a ter em

atenção quando se pretende estabelecer um biobanco estão descritos em diretivas e manuais de boas práticas elaborados pelas mais variadas organizações. Como a Organização para a Economia, Cooperação e Desenvolvimento (OECD), o Biobanco Europeu de tecidos tumorais humanos congelados (TUBAFROST), a Sociedade Internacional de repositórios biológicos e ambientais (ISBER) com as boas práticas para repositórios: Colheita, armazenamento, e recuperação de materiais biológicos humanos para investigação. O Conselho de Investigação Médica (MRC) com as amostras biológicas e tecidos humanos para uso em investigação. E o Instituto nacional do cancro (NCI) com as boas práticas de gestão dos produtos biológicos.

### 2.6.1 Aspectos ético-legais

Os biobancos, ao conterem amostras e dados associados da população, levantam uma série de questões éticas na sociedade atual. Ao longo dos anos os biobancos têm aumentado em número e complexidade, levando ao aparecimento de novas questões <sup>(6)</sup>. Devido à evolução constante da ciência e da tecnologia, os temas éticos associados aos biobancos, exigem uma avaliação constante <sup>(6)</sup>. O papel do conselho de revisão da ética não é necessariamente o mesmo para todas as instituições <sup>(14,75)</sup>. Estas trabalham no sentido de assegurar proteção para os participantes garantindo o uso apropriado das suas amostras <sup>(76, 77)</sup>. Apresentam um papel crucial no assegurar da confiança pública e no desenvolvimento e integração dos biobancos.

### 2.6.2 Consentimento informado

É o tema mais debatido na participação dos biobancos. O consentimento informado permite que os indivíduos decidam como as amostras fornecidas vão ser usadas na investigação <sup>(6)</sup>. Existe uma enorme variedade de pontos de vista e políticas relativas ao consentimento apropriado tanto no armazenamento das amostras biológicas como no uso dos dados em futuras investigações <sup>(12)</sup>. Todos os autores concordam que os participantes não devem participar sem o seu consentimento, e que todos devem estar bem informados e entender a finalidade da investigação, assim como os benefícios e riscos esperados. Só depois disso é que se pode obter um consentimento voluntário por parte dos participantes <sup>(6, 23)</sup>. Alguns autores defendem a oportunidade de cada participante poder retirar o seu consentimento <sup>(13, 14)</sup>, no entanto este retirar do

consentimento abre novas questões sobre o que pode ser realmente retirado? Em que ponto do estudo? Não existe um consenso sobre esta questão <sup>(15)</sup>.

De acordo com as boas práticas de ISBER <sup>(22)</sup> o consentimento informado para a recolha, armazenamento e utilização das amostras é um processo que oferece aos participantes a informação suficiente relativa à finalidade do biobanco, permitindo-lhes fazer uma escolha informada sobre a possibilidade de fornecer amostras e dados para o repositório e quando aplicável, para fins de investigação futura. O consentimento só deve ser obtido em condições em que o potencial dador tenha oportunidade de considerar se deve ou não participar. A informação que é dada ao dador deve ser compreensível para o sujeito ou para o seu representante. O consentimento pode ser obtido para um projeto de investigação específico ou pode ser obtido para futuras investigações, neste caso as informações gerais sobre os possíveis usos futuros da investigação são fornecidas, de acordo com os regulamentos e políticas nacionais ou locais aplicáveis. Os dadores devem ter o direito de retirar o consentimento tendo as suas amostras e dados retirados do repositório, a menos que as amostras ou os dados demográficos sejam anónimos não podendo ser ligados às identidades dos dadores.

A quantidade de informação dada aos participantes varia segundo um consentimento amplo a um consentimento totalmente restrito <sup>(16)</sup>.

**Modelos de consentimento informado para investigação de amostras num biobanco <sup>(17)</sup>:**

**Consentimento amplo** - Permite o uso das amostras biológicas e dos dados relacionados em investigações imediatas e em futuras investigações de qualquer tipo, a qualquer momento.

**Consentimento restrito** - Permite o uso das amostras e dados relacionados num tipo específico de investigação e em futuras investigações.

**Consentimento específico** - Permite o uso das amostras e dados relacionados somente em investigação imediata; proíbe qualquer estudo futuro que não esteja previsto no momento da autorização inicial.

Vários países como o Canadá, Alemanha, Noruega, Holanda e EUA permitem o uso das amostras e dados associados sem o consentimento dos participantes desde que estas amostras não sejam identificáveis. Na Islândia, a Comissão Nacional de Bioética decide se há ou não necessidade de pedir um novo consentimento, na Estónia e Reino Unido como inicialmente os pacientes são convidados a dar um consentimento amplo, já não há necessidade de voltar a pedir <sup>(18)</sup>. Diversos autores referem discordância de opinião

relativamente ao tipo de consentimento, sendo que alguns preconizam um consentimento padronizado, uma forma universal. Sendo este mais prático e assegurando deste modo comparabilidade entre os diversos biobancos <sup>(19)</sup>. Outros autores discordam e sugerem que as diferenças geográficas, sociais e religiosas devem ser respeitadas, assim como os diferentes fins de investigação <sup>(20)</sup>. O documento de consentimento informado deve incluir o formulário de consentimento e a ficha de informação, ambos devem ser submetidos a discussão e aprovação por um Comité de Ética independente <sup>(21)</sup>. Alguns autores propuseram a sua forma de consentimento padronizado universal <sup>(17)</sup>. O formulário de consentimento abrange: consentimento do participante para o armazenamento das suas amostras e dados relacionados, a natureza e os propósitos dos estudos a serem realizados; consentimento para estudos específicos e para futuras investigações associadas; consentimento para usar os resultados destes estudos para publicações científicas, fins de comercialização ou de ensino, declaração do participante em como foi informado do direito de retirar o seu consentimento a qualquer momento assim como da destruição das amostras e dos dados de forma irreversível, e por fim uma declaração do participante referindo que foi informado do direito de requerer os resultados obtidos nas diversas investigações <sup>(17)</sup>.

A maioria dos autores apoia o facto de que um consentimento amplo é mais sensato para uma investigação futura, sendo que os detalhes da investigação não são conhecidos no momento em que o consentimento é obtido. Foram propostas algumas condições que devem ser respeitadas no caso de um consentimento amplo, a investigação deve ser de grande importância, máxima privacidade para os participantes, sendo que em qualquer momento podem retirar o seu consentimento e todas as investigações tem de ser aprovadas por um comité de ética <sup>(14,16)</sup>. Foi reconhecido que voltar a entrar em contacto com os participantes do estudo para obter um novo consentimento é um processo dispendioso, demorado e confuso (criando nos participantes ansiedade e preocupação) <sup>(6)</sup>.

Em caso de morte do participante, voltar a pedir o seu consentimento é impossível, levantando-se a questão, deve-se dar continuação à investigação realizada? Poucos autores abordaram este tema, sendo que estes referem que as amostras podem ser usadas em todos os casos, exceto quando havia um desejo expresso anteriormente em não usar em investigações futuras <sup>(14)</sup>.

### 2.6.3 Privacidade e identidade das amostras

A proteção da identidade dos participantes é uma questão ética fundamental. O primeiro passo no processo de proteção é o consentimento informado. Os biobancos armazenam informação genética com ligação a um fenótipo particular, sendo a ligação entre estes o que apresenta maior risco de ameaça à privacidade dos participantes <sup>(28)</sup>. Existe uma preocupação generalizada de que as companhias de seguros e os patrões possam aceder às informações pessoais. Além disso os resultados da investigação podem também prejudicar não apenas os indivíduos mas todo o grupo (caso existisse uma predisposição genética ou outras informações relevantes) <sup>(6)</sup>.

Existem diferentes níveis de identificabilidade, segundo a Recomendação do Conselho da Europa de 2006 temos <sup>(31)</sup>:

**Materiais biológicos identificáveis** - são aqueles que por si só ou em combinação com os dados associados, permitem a identificação da pessoa em causa, quer diretamente quer através da utilização de um código. Neste último caso, normalmente o investigador clínico é o responsável pela ligação do código aos dados pessoais <sup>(31)</sup>. Este nível permite ao participante monitorização e acompanhamento clínico e a possibilidade de retirar as suas amostras do biobanco <sup>(32)</sup>.

**Materiais biológicos não identificáveis** - são materiais anónimos que, por si só ou em combinação com dados associados, não permitem a identificação da pessoa em causa <sup>(31)</sup>. Como não permitem identificar os participantes, torna-se impossível, que estes retirem as suas amostras e os dados do biobanco, que venham a ter conhecimento dos resultados da investigação ou que tenham acompanhamento e monitorização clínica <sup>(32)</sup>. Usar amostras anónimas é a melhor maneira de proteger as informações pessoais, mas limita a utilidade da investigação, especialmente o potencial para transformar biobancos em estudos epidemiológicos longitudinais <sup>(13)</sup>. Esta preocupação fundamental com a privacidade também é geralmente a principal preocupação dos participantes quando eles estão a decidir se vão doar as suas amostras. Um estudo mostrou que até 90% das pessoas estavam preocupadas com a sua privacidade <sup>(30)</sup>. Assim, as consequências da quebra de privacidade podem afetar substancialmente a disposição do público a participar e deste modo atrasar a investigação <sup>(15, 33)</sup>.

### 2.6.4 Divulgação dos resultados para os participantes

Eticamente, os dadores têm o "direito de saber ou não saber" os resultados das investigações dependendo das circunstâncias da colheita e do teste efetuado <sup>(6)</sup>. No

entanto a questão não é pacífica nem consensual. Existem argumentos diferentes apresentados para quem defende a divulgação dos resultados e pelos que consideram que essa divulgação não é útil nem necessária.

#### 2.6.4.1 Argumentos contra a divulgação dos resultados

Um dos argumentos contra a divulgação dos resultados da investigação centra-se na distinção entre a investigação e a prática da medicina <sup>(34)</sup>. Ao divulgar os resultados da investigação individual pode-se combinar a função de médico com a de investigador. Podendo os participantes serem vítimas do “equivoco terapêutico” ou do “equivoco do diagnóstico” <sup>(35)</sup>, os pacientes que não estiverem a par do estudo podem fazer suposições incorretas sobre a natureza, significado e utilidade da informação que irão receber. Podendo sofrer por aumento da ansiedade, sendo submetidos a testes desnecessários de *follow-up* com base em resultados inconclusivos ou não interpretáveis. Sendo esta questão ainda mais relevante quando o próprio investigador é médico do participante <sup>(35)</sup>. Outros argumentos contra a divulgação dos resultados passam pela carga financeira, pela logística e pelo tempo que os investigadores iriam precisar para a divulgação dos resultados, atrasando assim o progresso da investigação. Entrar em contacto com os participantes do estudo para fornecer os resultados do estudo, principalmente se esta possibilidade não esta descrita no formulário do consentimento, levanta vários problemas incluindo questões de privacidade ou implicações para os membros da família, tendo estes o direito de não conhecer as suas predisposições genéticas <sup>(36)</sup>.

#### 2.6.4.2 Argumentos a favor da divulgação dos resultados

Um argumento a favor da divulgação baseia-se no princípio do respeito pelas pessoas, os participantes têm o direito de saber os resultados da investigação se assim o desejarem <sup>(37)</sup>. Bookman *et al.*, defende que os resultados com relevância na saúde devem ser sempre divulgados <sup>(38)</sup>.

Outra abordagem é descrita como “divulgação em camadas”, esta propõe que os participantes selecionem a partir de uma gama de opções os tipos de resultados que pretendem receber (diagnóstico, reprodutivo ou outros), assim como a duração do tempo do estudo no qual os participantes querem os resultados divulgados e o método de notificação (*e-mail*, telefone, etc.) <sup>(35)</sup>.

Asai *et al.*, relata a opinião dos participantes sobre a divulgação dos resultados da investigação, sendo que, em primeiro lugar, alguns pacientes estavam dispostos a permitir que os investigadores usassem as informações arquivadas e as amostras sem consentimento, enquanto outros afirmam que só devem ser usadas após um consentimento informado individual <sup>(39)</sup>. Outros optaram por não ter as suas informações médicas e amostras biológicas usadas. Em segundo lugar foi considerado pelos pacientes como um pré-requisito essencial a comunicação dos resultados do estudo, sendo que os participantes leigos queriam um aviso prévio sobre a natureza da investigação em questão e pretendiam informação relativa à identidade dos investigadores responsáveis. Em terceiro lugar, alguns pacientes estavam preocupados com os padrões éticos dos investigadores e com dúvidas se a sua privacidade e confidencialidade estava devidamente protegida por eles <sup>(39)</sup>. Os participantes e os médicos compartilhavam a crença que se os dados ou amostras não podem ser mais ligadas aos dadores a possibilidade de dano era eliminada <sup>(40)</sup>.

As investigações epidemiológicas são indispensáveis para o progresso da medicina, que por sua vez conduz a uma melhor qualidade de vida das pessoas. Por outro lado, a privacidade é essencial de modo que cada pessoa possa ter uma vida verdadeiramente autónoma com dignidade, liberdade e segurança. Ninguém deve viver a sua vida com ansiedade ou com medo de que os investigadores a qualquer momento usem as suas informações pessoais sem permissão. Assim, proteger a privacidade e os avanços da ciência são, indiscutivelmente, de igual valor e não pode ser sacrificado um em prol do outro. É necessário que os dadores fiquem cientes que os seus registos médicos ou materiais biológicos podem ser posteriormente usados para fins de investigação. A identidade dos investigadores que terão acesso à informação e às amostras dos indivíduos também devem ser divulgadas, a fim de aumentar a confiança do dador em projetos de investigação e diminuir a sua ansiedade em relação ao abuso de privacidade <sup>(39)</sup>.

#### 2.6.5 Envolvimento público e confiança

O pré-requisito mais importante para o sucesso da investigação relacionada com o biobanco é garantir a confiança do público. Esta pode ser conseguida através da educação contínua das pessoas (palestras informativas) e da proteção da sua privacidade. O fim da confiança pública pode ter consequências graves nos biobancos,

mas as principais vítimas são as pessoas que esperam melhorias nos sistemas de saúde<sup>(14)</sup>. Nos artigos de revisão que estudam a opinião pública sobre os biobancos confirmou-se que as pessoas geralmente eram solidárias e entusiasmadas na participação nos biobancos<sup>(30, 55, 56)</sup>. Vários artigos também confirmam que as pessoas que foram educadas e informadas sobre os biobancos estavam ainda mais dispostas a participar<sup>(57)</sup>. Cada vez mais estão a ser realizados eventos regulares para garantir a confiança do público e facilitar o seu envolvimento<sup>(57-59)</sup>. Durante esses eventos, as pessoas são encorajadas a aprender, debater e discutir os objetivos e as metas dos biobancos. Estes eventos proporcionam um maior envolvimento do público na investigação<sup>(58, 59)</sup>.

### 2.6.6 *Envolvimento de menores e doentes incapacitados nos biobancos*

O envolvimento de menores nos biobancos levanta vários problemas éticos, levando a que muitos biobancos não incluam amostras deste grupo. Os menores têm uma capacidade limitada de compreender as questões éticas referentes ao biobanco, representando a população mais vulnerável<sup>(6)</sup>. Os biobancos ao não incluírem amostras deste grupo podem prejudicar a investigação, logo alguns autores ponderam a ideia do envolvimento se o risco associado for minimizado<sup>(60-63)</sup>. Como estes precisam de proteção extra, alguns autores sugeriram que a partilha de dados sobre os menores deve ser proibida até que os mesmos alcancem a idade adulta<sup>(64)</sup>. No entanto, outros autores opuseram-se a esta sugestão, argumentando que essa proposta iria atrasar a investigação. Além disso, os pais normalmente pedem os resultados das investigações sobre os seus filhos, sendo que a maioria dos autores concorda que esta não seria uma política eticamente aceitável<sup>(61, 65)</sup>. Sendo que os pais têm o direito de decidir se querem envolver os seus filhos num biobanco, tendo o direito de dar consentimento informado em vez dos menores. No entanto, os menores devem decidir se querem saber os seus próprios resultados quando atingirem a idade adulta. Além de obter o consentimento informado dos pais, é de opinião geral que os investigadores também devem pedir o consentimento dos filhos sempre que possível<sup>(66)</sup>. Os investigadores devem sempre respeitar o medo ou a discordância em participar da criança. O conselho de ética deve ser consultado em cada investigação realizada em crianças, a fim de proteger os interesses das mesmas<sup>(66, 67)</sup>.

De acordo com Hens *et al*, antes de envolver um menor no biobanco é necessário atender a três requisitos principais: permissão por parte do representante legal; permissão do menor; e avaliação precisa dos riscos/benefícios e da importância da investigação <sup>(68)</sup>.

Princípios éticos semelhantes aplicam-se aos participantes incapacitados, como por exemplo os que sofrem de doenças psiquiátricas. Devendo ser sempre cuidadosamente protegidos e expostos a um risco mínimo. O responsável deve assinar o consentimento informado e o conselho de ética deve ser consultado em todos os casos para proteger o interesse dos adultos incapacitados <sup>(69)</sup>.

### 2.6.7 Comercialização

Apesar do foco central dos biobancos se encontrar na investigação e na melhoria do conhecimento médico, não impede as empresas privadas de tentarem usar esses dados/amostras para o seu próprio interesse. Um exemplo típico de comercialização ocorre na investigação farmacogenômica suportada pelas companhias farmacêuticas <sup>(71, 73)</sup>. Estas suportam a investigação que pode vir a melhorar o tratamento de muitas doenças <sup>(15, 74)</sup>. Levantando a comercialização questões éticas, como a prevenção da exploração, garantindo a equidade aos participantes do estudo e o equilíbrio entre o custo e o benefício <sup>(70)</sup>. Alguns artigos referem que a comercialização tende a diminuir a confiança pública nos biobancos <sup>(30, 71, 72)</sup>.

### 2.6.8 Troca de informação

Muitos autores afirmam que a colaboração internacional é bastante útil devendo ser incentivada, desde que os dadores fiquem sujeitos a um risco mínimo. A troca de dados entre os diferentes grupos de investigação que trabalham em diferentes biobancos pode facilitar a investigação, no entanto surge uma barreira, o diferente *design* entre os biobancos <sup>(6)</sup>. Surgindo assim a necessidade de uma maior harmonização internacional dos princípios e do *design* dos biobancos, desempenhando os conselhos de revisão da ética um importante papel na regulação deste processo <sup>(14, 71, 78)</sup>. Várias instituições já estabeleceram regras, normas nacionais e internacionais de cooperação <sup>(71)</sup>. A principal questão ética envolvendo a integração e a harmonização dos conjuntos de dados presentes nos biobancos é a proteção da privacidade dos participantes. Sendo que os

conselhos de revisão da ética devem ter um papel importante na supervisão desta harmonização <sup>(14)</sup>.

### 2.6.9 Partilha de benefícios

São reconhecidos os aspetos comerciais dos biobancos, estando os esforços focados na necessidade de elaborar uma política de partilha ou de distribuição de eventuais lucros ou benefícios <sup>(15)</sup>. O debate sobre os direitos de propriedade do material biológico é um assunto muito ativo <sup>(79)</sup>. Cambon T *et al*, <sup>(15)</sup> destaca que a maioria das regulamentações atuais sobre a investigação são construídas sobre uma teoria da autonomia, que é independente de qualquer direito sobre a amostra.

O benefício financeiro através dos resultados da investigação, pode ser compartilhado entre os participantes, entre as comunidades que fazem parte da investigação, os investigadores e as suas instituições. Há um interesse substancial da indústria nesta investigação. Em termos de repartição de benefícios os biobancos devem encontrar um equilíbrio entre os muitos interesses concorrentes das várias partes interessadas no processo <sup>(15)</sup>. Existe um alto nível de concordância entre os autores, de que os dadores de materiais biológicos não devem ser pagos. Os dadores acabaram por lucrar com os resultados que irão melhorar o futuro diagnóstico e o tratamento das doenças na população <sup>(80)</sup>.

Vários autores sugerem que as reações negativas levantadas entre os dadores poderiam ser evitadas através da partilha profissional e responsável da informação, educando os dadores sobre o processo de investigação <sup>(70)</sup>.

### 2.6.10 Proprietários das amostras

Relativamente ao material doado, alguns autores defendem que as amostras e dados, à exceção das totalmente anonimizadas, devem pertencer ao dador <sup>(81)</sup>. Em geral os biobancos consentem em não ser os proprietários, mas sim os administradores do material doado <sup>(82)</sup>. Segundo O'Brien <sup>(83)</sup> o material dos biobancos deve ter propriedade partilhada entre os dadores, investigadores e instituições. Mas esta questão continua incerta e pouca discutida <sup>(6)</sup>.

Em Portugal, a lei nº12/2005 de 26 de Janeiro <sup>(1)</sup> decreta que o material biológico armazenado é considerado propriedade da pessoa dadora ou, depois da sua morte ou incapacidade, dos seus familiares. O consentimento pode ser retirado a qualquer altura

pelo dador a quem o material biológico pertence ou, depois da sua morte ou incapacidade, pelos seus familiares, devendo nesse caso as amostras biológicas e os derivados armazenados serem definitivamente destruídos. Compete aos investigadores responsáveis zelar pela conservação e integridade das amostras e informar os dadores de quem foi obtido o consentimento de qualquer perda, alteração ou destruição, assim como da sua decisão de abandonar um tipo de investigação ou de fechar o biobanco.

#### 2.6.11 Infra-estruturas e instalações

As infra-estruturas dos biobancos dependem do tipo de material a ser armazenado, das condições necessárias de armazenamento, do período de retenção e do uso pretendido destes materiais <sup>(84)</sup>. Segundo Caboux <sup>(84)</sup> nas instalações de armazenamento de um biobanco deve existir: (1) Ar condicionado que mantenha a temperatura ambiente nos  $\leq 22$  ° C a fim de evitar o excesso de desgaste do congelador e falha prematura deste. (2) As infra-estruturas devem ser equipadas com um sistema que restringe o acesso de forma adequada ao pessoal autorizado e protege contra a intromissão de intrusos. Somente as pessoas designadas para a operação devem ter acesso ao material, e todos os materiais adicionados ou retirados devem ser documentados. (3) As infra-estruturas precisam de uma fonte constante de energia elétrica. Caso a energia falhe em algum momento, é necessário um sistema de energia de reserva. Este sistema deve ter a capacidade de funcionar por tempo suficiente para permitir o restabelecimento do fornecimento de energia (normalmente de 48-72 horas) e deve ser testado regularmente. (4) Devem existir congeladores de reserva, para substituição, no caso de avaria de algum dos equipamentos do frio. (5) Cada congelador deve ter um sistema de segurança básico. Os sistemas devem ser monitorados respondendo com alarmes (24 horas por dia, 7 dias por semana). De modo a garantir que as pessoas responsáveis possam tomar as medidas necessárias para responder em um período de tempo que impeça ou minimize a perda ou o dano do material guardado. (6) Sempre que possível, recomenda-se dividir as amostras armazenadas, cada conjunto armazenado em um local diferente. Esta estratégia irá evitar perdas desnecessárias no caso de eventos adversos.

#### 2.6.12 Sistemas de informação

Os sistemas de informação são uma parte integrante e de suporte para qualquer biobanco sendo obrigatório a presença destes sistemas para a viabilidade dos biobancos.

Além do material biológico uma enorme quantidade de dados relacionados com o doente são necessários: registos clínicos, análises de laboratório, imagens microscópicas, informações sobre o estilo de vida, informação genética, informações acerca do fenótipo, entre outras. Juntando todos estes dados no decurso de um único estudo seria altamente ineficiente e dispendioso. O biobanco deve disponibilizar os dados necessários para este tipo de investigação e compartilhar os dados e materiais entre os investigadores <sup>(85)</sup>. Implica um sistema que registre todos os dados das fases de manuseamento das amostras desde a sua entrada até à saída do biobanco.

É um grande desafio para os sistemas de informação de um biobanco integrar os dados das diversas formas que resultam das diferentes fontes autónomas. Os biobancos apresentam projetos de integração e interoperabilidade de modo a melhorar esta questão. A dinâmica da investigação é outra questão importante, uma vez que uma nova visão leva a um diagnóstico mais diferenciado, novos métodos de análise, permitindo a avaliação de medidas adicionais, ou melhorando a precisão das medições. Deste modo o sistema de informação dos biobancos está em constante evolução <sup>(85)</sup>.

Os biobancos contêm informações pessoais dos dadores, de modo a proteger a privacidade e anonimato destes é obrigatório impedir o uso indevido das informações armazenadas <sup>(85)</sup>.

O código de barras é o numerador comum e identificador de uma amostra. Este código pode ser utilizado tanto em formulário 1D como 2D, capturando identificadores importantes para cada tipo de amostra. A informação do código de barras está alinhada com os dados clínicos e os detalhes do registo de dados. O sistema de gerenciamento das informações do laboratório (LIMS) é o *software* de interface que armazena e gere todos os dados associados com a amostra, incluindo dados clínicos, demográficos, local de armazenamento e vida útil de armazenamento, bem como a ligação a bases de dados adicionais. O LIMS também fornece dados sobre a história do uso de cada tubo da amostra <sup>(85)</sup>. Um bom sistema de informação deve permitir a rastreabilidade das amostras e das análises efetuadas, assim como os controlos de qualidade realizados. Deve permitir a codificação das amostras, de modo a proteger a privacidade dos participantes.

### 2.6.13 Procedimentos operacionais padrão (POPs)

A colheita é um passo integral da investigação clínica, as amostras dos indivíduos com doença ou sem doença são ferramentas importantes. O acesso a amostras de alta qualidade, recolhidas e tratadas de forma padronizada diminuem os fatores de confusão. Pequenas diferenças no processamento ou na manipulação de uma amostra podem ter efeitos drásticos na confiabilidade e na reprodutibilidade. Para diminuir estas diferenças foi criado um grupo de trabalho que desenvolve procedimentos operacionais padronizados de modo a analisar os vários tipos de amostras/dados colhidos <sup>(87)</sup>. É imperativo o uso de metodologias de colheita padrão para que os resultados dos testes de investigação sejam traduzidos em futuros testes clínicos e de diagnóstico. A variável-chave em qualquer análise é que as amostras caso e controle sejam tratadas da mesma maneira em todo o processo, desde o projeto de estudo à colheita de amostras para análise dos dados <sup>(87)</sup>. O estabelecimento de POPs permite a análise das amostras colhidas por diferentes grupos. Pequenas diferenças nos POPs entre os grupos poderia provocar resultados não interpretáveis, devido às variações sujeitas nas várias etapas do processo de colheita e no manuseamento das amostras. As amostras tanto dos casos como dos controlos devem ser manuseadas de forma igual no que diz respeito aos procedimentos de colheita, processamento, armazenamento e transporte. Sendo fundamental para que os investigadores possam ter a certeza que as diferenças encontradas entre os dois grupos sejam devido a diferenças reais, entre o estado de doença e não doença, e não de viés na manipulação das amostras <sup>(87)</sup>. Os POPs devem fornecer instruções lógicas, sistemáticas e detalhadas. Devem fornecer detalhes suficientes para permitir que alguém novo compreenda e execute os procedimentos de forma consistente.

As variáveis que podem alterar os resultados com impacto analítico incluem: (1) o tipo de aditivo nos tubos de colheita; (2) o tempo de processamento da amostra ou temperatura; (3) a hemólise da amostra; (4) os parâmetros de armazenamento da amostra; e (5) o número de ciclos de congelamento e descongelamento <sup>(87)</sup>.

Qualquer biomarcador validado deve incluir especificações para o seu uso em um ambiente clínico, incluindo variáveis pré-analíticas na colheita, processamento e armazenamento. Os POPs abordam etapas de manipulação e processamento de amostras consistentes que fornecem uma base sobre a qual construir um teste clinicamente válido para a deteção precoce de determinadas doenças. Amostras colhidas sob os POPs com

documentação cuidadosa das variáveis de colheita e tratamento de dados, vai ajudar a responder a muitas questões importantes.

#### 2.6.13.1 POPs – Colheita

As amostras biológicas muitas vezes são armazenadas para fins de investigação e os métodos usados para efetuar a colheita vão depender do uso final pretendido <sup>(88)</sup>.

A disponibilidade das amostras e os objetivos da análise destinados à sua utilidade deve ser considerado antes de se iniciar a colheita das mesmas. É importante verificar a sensibilidade dos diferentes tipos de amostras ao efetuar a colheita, processamento e armazenamento. Os tipos de amostras podem variar entre as amostras viáveis e as não viáveis; portanto, protocolos de colheita devem incorporar os requisitos necessários para a preservação da viabilidade, funcionalidade, integridade estrutural e estabilidade das células, tecidos ou órgãos. Além do tipo de amostra, outros fatores como o *status* do dador, o método de recolha ou o recipiente da amostra pode afetar a mesma. A logística do planeamento da colheita tem em conta a distância do ponto da colheita para o laboratório de processamento, o transporte e a segurança das instalações de armazenamento. Protocolos para a estabilização e / ou preservação das amostras durante o transporte podem ser necessários <sup>(22)</sup>.

Devido à importância dos processos pré-analíticos, desde os procedimentos realizados entre o tempo da colheita da amostra até ao momento da sua análise devem-se aplicar estratégias que mantêm a estabilidade e funcionalidade das amostras. Procedimentos rigorosos são igualmente necessários para a rotulagem e o rastreamento das amostras. Com base na disponibilidade das amostras, um repositório pode colher e processar muitas amostras diferentes (por exemplo, tecido sólido, sangue, saliva, urina) do mesmo caso <sup>(22)</sup>.

A saliva é um fluido biológico usado na deteção de diferentes biomarcadores, tais como proteínas, drogas e anticorpos. A recolha da saliva é não-invasiva, acessível, e um meio de diagnóstico eficiente <sup>(88)</sup>.

Além disso, um repositório pode processar cada amostra em vários formatos. Esta redundância no fornecimento da amostra permite uma otimização no seu uso futuro; no entanto, deve-se considerar as limitações na capacidade de armazenamento do repositório quando se recolhe vários tipos de amostras <sup>(22)</sup>.

### 2.6.13.2 POPs – Transporte

Após a colheita as amostras biológicas devem ser enviadas para o biobanco pelo meio de transporte mais adequado. É importante considerar o método de transporte, o regulamento, o tempo/distância de transporte, o clima e a estação do ano. Assim como o tipo e a quantidade das amostras a enviar <sup>(10)</sup>.

A qualidade da amostra é de extrema importância, se a amostra não se encontrar devidamente protegida, pode ficar danificada durante o transporte ou pode ficar retida. A embalagem, que transporta a amostra, deve ser desenhada de forma a impedir qualquer dano durante o transporte, garantindo assim a integridade da amostra. Para garantir um transporte adequado é útil a concepção de um *kit* de colheita específico, assim como material e instruções específicas <sup>(10)</sup>.

É da responsabilidade do remetente garantir a correta classificação, embalagem, rotulagem e documentação de todas as amostras destinadas ao transporte. Este deve rever todos os relatórios de ensaio da embalagem para garantir que as normas sejam respeitadas. Os testes podem incluir medição de todos os parâmetros que possam influenciar a integridade da amostra.

Deve-se utilizar um sistema de embalagem tripla sendo constituído por: 1) recipiente primário, impermeável que contém a amostra, envolvido em material absorvente para no caso de rutura, a amostra ser totalmente absorvida; 2) recipiente secundário, impermeável que encerre e proteja os recipientes primários; e 3) embalagem exterior de material amortizado, onde é colocada a embalagem secundária. Esta embalagem protege contra possíveis danos exteriores que ocorram durante o transporte.

Em algumas situações, especialmente relacionadas com amostras extremamente valiosas, os biobancos podem optar por enviar uma primeira remessa de teste que se aproxima das características da efetiva amostra. Isto pode informar o remetente quanto à adequação da embalagem e também serve para identificar eventuais obstáculos <sup>(22)</sup>.

O transporte eficiente e a transferência das amostras requer uma boa coordenação entre o remetente, o transportador e o recetor para garantir que o material é transportado com segurança, chega a tempo e em boas condições. Essa coordenação depende de comunicações bem estabelecidas e de uma boa relação de trabalho entre as três partes <sup>(89)</sup>.

O primeiro passo na preparação de um carregamento para transporte é a determinação das especificações para as amostras. O remetente deve determinar se os requisitos regulamentares estão a ser cumpridos, bem como as exigências físicas necessárias para

garantir as condições de transporte adequadas. O remetente deve primeiro determinar como classificar as amostras que estão a ser transportadas. As amostras enviadas a partir de repositórios, como substâncias infecciosas, amostras de diagnóstico, produtos biológicos, organismos geneticamente modificados e microrganismos ou substâncias tóxicas podem ser consideradas mercadorias perigosas. Além disso, os conservantes que foram aplicados às amostras podem ser considerados tóxicos, inflamáveis ou corrosivos. Para classificar corretamente as amostras deve-se consultar os respectivos regulamentos de transportes federais, bem como os da Organização de Aviação Civil Internacional (ICAO) e a Associação Internacional de Transporte Aéreo (IATA)<sup>(22)</sup>.

O envio de amostras de origem humana é regulado por diversos regulamentos nacionais e internacionais. O transporte de qualquer mercadoria perigosa ou não, é uma questão comercial de uma transportadora. Esta caso não deseja transportar determinadas mercadorias não está sob nenhuma obrigação legal de fazê-lo. Muitas operadoras são "portadores privados" e têm o direito de recusar o transporte de mercadorias ou acrescentar requisitos adicionais<sup>(89)</sup>.

Muitos países exigem que o pessoal envolvido no transporte de mercadorias perigosas receba formação nesta área, mantendo esta formação atualizada<sup>(22)</sup>.

A temperatura de transporte deve ser respeitada, caso a amostra seja enviada à temperatura ambiente o *kit* de colheita deve ser projetado para manter essa temperatura. Devendo conter um sensor de temperatura para verificar a variação da temperatura durante o transporte. É aconselhável um dispositivo de gravação da temperatura durante o transporte para garantir que os requisitos de temperatura não foram ultrapassados<sup>(22, 89)</sup>. Devem ser tomadas medidas adicionais para proteger as amostras de possíveis atrasos que venham a acontecer como a adição de gelo seco suficiente para mais de 24h além da duração esperada do transporte<sup>(89)</sup>. Vários investigadores<sup>(90-93)</sup> têm mostrado que o número de ciclos de congelamento e descongelamento de uma amostra provoca um efeito negativo na qualidade da mesma.

Transportes internacionais, licenças especiais ou outros requisitos podem ser exclusivos para determinados países e regiões. Alguns países têm regulamentos relacionados com as questões éticas que proíbem a importação / exportação de certos tipos de amostras humanas ou têm exigências específicas relativas à importação / exportação de tais amostras<sup>(22)</sup>.

Durante o transporte da encomenda, tanto o remetente como o destinatário podem acompanhar todo o processo de transporte da mesma, através do seu seguimento<sup>(94)</sup>.

Notificação de Embarque, o transportador deve notificar o destinatário que uma transferência está programada para chegar em uma data específica. O destinatário deve confirmar que é capaz de receber o pacote e que têm as instalações adequadas para o seu armazenamento <sup>(22)</sup>.

A confirmação do momento da chegada da encomenda e a condição da amostra devem ser documentadas para cada entrega <sup>(22)</sup>.

#### 2.6.13.3 POPs – Recepção, processamento e armazenamento

O biobanco ao receber as amostras deve manter um registo de entrada onde consta toda a documentação referente à amostra, incluindo data e hora da entrada, verificação das condições da embalagem e da temperatura do transporte assim como as possíveis não conformidades <sup>(22)</sup>.

O processamento da amostra varia de acordo com o tipo específico da investigação e com a colheita das amostras <sup>(22)</sup>. Protocolos padronizados devem ser aplicados de forma consistente no armazenamento das amostras de modo a garantir a sua qualidade, evitando a introdução de variáveis em estudos na investigação <sup>(88)</sup>. Devem ser sempre registadas as condições de armazenamento, juntamente com qualquer desvio nos POPs, incluindo informações sobre a temperatura, ciclos de congelamento/descongelamento assim como eventuais falhas nos equipamentos <sup>(22)</sup>. Descongelamentos e congelamentos desnecessários devem ser evitados uma vez que apresentam um efeito negativo na qualidade das amostras, é recomendado guardá-las em alíquotas para evitar descongelamentos repetidos <sup>(88)</sup>. Como medida de segurança é indicado que sejam guardadas duas alíquotas da mesma amostra em arcas diferentes <sup>(84)</sup>.

#### 2.6.13.4 POPs – Controlo de qualidade

A finalidade de um repositório consiste em fornecer materiais biológicos e os seus dados associados respeitando os critérios específicos de qualidade. Portanto, um sistema de gestão da qualidade deve cobrir todo o espectro de operações de um repositório. A implementação e manutenção de um sistema de gestão da qualidade contribui para a sustentabilidade a longo prazo dos repositórios <sup>(22)</sup>.

Os repositórios devem ser capazes de monitorar cuidadosamente cada uma das amostras que são recebidas, processadas e distribuídas a partir da instalação. Precisão e pontualidade são fundamentais para garantir uma utilização futura eficaz <sup>(22)</sup>. Os

sistemas devem ser estabelecidos para verificar se todas as amostras são tratadas de forma adequada. Estes sistemas envolvem procedimentos operacionais padronizados, que são descrições precisas das tarefas executadas e podem envolver as atividades de verificação por mais de um técnico ou por um supervisor.

Garantia da Qualidade é um sistema integrado de atividades de gestão, envolvendo o planeamento, a execução, documentação, avaliação e melhoria para garantir que um produto é do tipo e da qualidade necessária para o projeto. O controlo da qualidade é o sistema de atividades técnicas que mede os atributos e o desempenho de um processo, ensaio, item ou produto em relação aos padrões definidos para verificar se os requisitos estabelecidos são plenamente cumpridos <sup>(95)</sup>.

Cada repositório deve ter um sistema de gestão da qualidade, ou aderir a um programa de controlo de qualidade da organização com a qual o repositório está associado. O programa deve descrever abordagens que garantam que os requisitos de qualidade sejam cumpridos. Se não for possível ter um sistema de gestão de qualidade formal, com uma equipa dedicada, então uma política deve estar no local para rever os procedimentos e registos de modo a avaliar a eficácia e a qualidade das operações do repositório. Esta avaliação deve ser realizada pelo menos anualmente <sup>(96, 97)</sup>.

A responsabilidade pela gestão da qualidade deve ser atribuída a um membro da equipe, cuja responsabilidade é garantir funcionários treinados para cumprir os padrões de qualidade e fornecer orientação regular e instrução para todos os funcionários que devem ter uma responsabilidade coletiva para garantir a conformidade com os POPs, as políticas e os requisitos regulamentares. Devem ter a responsabilidade e autoridade para inspecionar e aprovar o manuseamento de amostras, as práticas de processamento e armazenamento. Um repositório deve ter uma política clara criando um sistema de relatórios, documentação e acompanhamento de qualquer desvio, incidente ou falha. Devendo os funcionários ser treinados e incentivados a relatar tais desvios <sup>(22)</sup>. Cada repositório deve desenvolver políticas e procedimentos em um formato padronizado escrito (POPs) que são incorporados num manual. Estes POPs devem ser utilizados para assegurar que todas as amostras são recolhidas adequadamente e de forma consistente e armazenadas de modo que possam ser eficazmente utilizadas posteriormente <sup>(22)</sup>.

### 2.6.13.5 POPs – Utilização e destruição das amostras

Os repositórios que contêm amostras devem assegurar mecanismos para manter a amostra e a qualidade dos dados, proteger a privacidade e confidencialidade do dador e assegurar que as amostras são compartilhadas de maneira que seja consistente com os padrões de consentimento e privacidade em que tais amostras e os dados foram obtidos<sup>(22)</sup>. Eles devem fornecer acesso a essas políticas para patrocinadores, dadores e, se necessário, para o público em geral.

Os biobancos devem ter políticas escritas bem estabelecidas para a partilha e distribuição das amostras, bem como os procedimentos para determinar o que constitui um uso adequado das amostras e dos dados na investigação. Estas políticas devem estar em conformidade com as regras, regulamentos e leis aplicáveis<sup>(22)</sup>.

Transferência de Dados - as amostras biológicas são mais úteis para a investigação científica quando acompanhadas de dados específicos que caracterizam a amostra e a sua fonte. É importante assegurar que esses dados serão utilizados de acordo com os requisitos legais adequados, incluindo consentimento, protocolo e outros documentos que regulam o biobanco. No caso de amostras de humanos, é importante proteger a identidade do sujeito / dador e privacidade<sup>(22)</sup>.

Segurança dos dados - os biobancos devem garantir que os dados são transmitidos de forma segura, minimizando a possibilidade de intercetção ou uso não autorizado, especialmente se a informação incluída identificar os dadores individuais. Os biobancos devem instruir os destinatários sobre as medidas de segurança de dados, incluindo o uso de proteção por senha e criptografia, se for o caso<sup>(22,88)</sup>.

Repartição de benefícios - os procedimentos dos biobancos para a colheita, armazenamento, distribuição, uso e eliminação das amostras devem respeitar as perspectivas e tradições dos dadores de quem foram obtidas as amostras. Os biobancos que importam amostras e dados de outros países devem respeitar os princípios do país fornecedor<sup>(22)</sup>. Em publicações resultantes da utilização de amostras, o biobanco deve ser reconhecido como a fonte da amostra. Antes do fornecimento das amostras, devem ser estabelecidas diretrizes, de modo que delimite entre aqueles casos em que o biobanco serviu apenas como uma fonte de amostras e os casos em que os membros da equipa do biobanco participaram ativamente no próprio projeto de investigação. Muitos repositórios são obrigados a apresentar um relatório anual para as agências de financiamento onde descrevem o resultado dos estudos que os investigadores realizaram com as amostras. Quando as amostras são utilizadas em publicações de investigação,

devem ser tomados cuidados para garantir a confidencialidade do dador <sup>(88)</sup>. Um acordo de transferência de material é um contrato que rege a transferência de materiais de investigação entre duas organizações, este define os direitos do remetente e do destinatário no que diz respeito aos materiais e a todos os derivados. Os materiais biológicos são os materiais mais frequentemente transferidos, mas este acordo também pode ser utilizado para outros tipos de materiais, tais como compostos químicos e até mesmo alguns tipos de *software* <sup>(22)</sup>.

Por vezes é necessária a eliminação de uma coleção inteira de amostras quer pela sua destruição quer pela sua transferência. Esta ação pode ser necessária periodicamente devido a limitações no espaço de armazenamento ou devido à necessidade de controlar os custos. Outras razões podem incluir questões de consentimento, mudanças regulatórias, modificações de protocolo e / ou integridade da amostra comprometida.

Devem ser estabelecidas políticas para a eliminação ou transferência das amostras quando o seu propósito original foi cumprido, ou quando já não são adequadas para os fins a que se destinavam ou se os participantes solicitaram a retirada das suas amostras. Estas políticas devem ser claramente descritas e abertamente disponíveis, conforme o caso, para os usuários e potenciais usuários das coleções de amostras <sup>(22)</sup>.

Os repositórios devem ter um sistema para monitorar a eliminação das coleções através da destruição da amostra ou da transferência para um novo depositário. O sistema deve incluir a documentação da história da colheita e o motivo da eliminação da coleção. A revisão administrativa pode ser útil para ver se há outros dentro da instituição afiliada ao repositório que possam fazer uso da coleção, desde que o consentimento o permita <sup>(88)</sup>.

Há uma série de circunstâncias que podem influenciar as decisões quanto à existência ou não de uma amostra que deva ser destruída. Algumas das razões para a destruição das amostras podem incluir: quando todas as informações de identificação foram perdidas, quando as amostras foram comprometidas por falha do equipamento, quando as amostras sofreram ciclos de congelamento e descongelamento de tal forma que o conteúdo molecular foi comprometido, quando exigido por consenso ou por projeto do estudo ou regulamento ou por falta de uso. Um repositório deve avaliar e documentar a destruição de todas as amostras. Esta informação pode ser importante para a gestão da qualidade do repositório e pode servir como um indicador para o repositório das áreas que precisam ser melhoradas <sup>(22,88)</sup>.

*OBJETIVOS*



## **III. Objetivos**

### 3.1 Questão Orientadora

Os biobancos têm suscitado o interesse da comunidade científica pela sua pertinência relativamente à investigação sobre as doenças comuns com impacto na saúde pública, nomeadamente, a associação entre variantes genéticas e doenças complexas, a sua interação com fatores ambientais e também com os fármacos, garantindo deste modo uma medicação mais dirigida e eficaz. A investigação científica é um desafio permanente e cada vez mais exigente, é reconhecida que a colaboração entre os diferentes laboratórios e as suas equipas, pode conduzir a novas ideias e a novas descobertas. O conceito de biobanco pode ainda ser desconhecido para muita gente, podendo para algumas pessoas, resumir-se a amostras em arcas frigoríficas. No entanto, um biobanco não é apenas uma sala com arcas frigoríficas. É do conhecimento da comunidade científica as potencialidades que a saliva apresenta em termos dos seus elementos básicos constituintes e da sua contribuição para o conhecimento da biologia oral e diagnóstico da patologia oral. A inclusão da saliva nestes biobancos é devida ao reconhecimento da sua utilidade, apresentando potencial para se tornar uma amostra de primeira escolha devido aos avanços nas tecnologias de deteção. Um biobanco de saliva ao ter amostras devidamente organizadas e com informação clínica associada é uma mais-valia. Através deste estudo pretendo identificar a informação que deve encontrar-se incluída numa base de dados resultante da recolha de saliva.

### 3.2 Objetivos

Este trabalho teve como base uma revisão da informação e legislação disponível sobre os biobancos que armazenam amostras de origem humana com os respetivos dados. Os objetivos específicos foram: i) a elaboração dos documentos que devem acompanhar a recolha da amostra de saliva; ii) uma avaliação preliminar do questionário aplicado aos dadores de saliva por investigadores com publicações usando amostras de saliva.



# *MATERIAIS E MÉTODOS*



## **IV. Materiais e métodos**

### 4.1 Elaboração de um questionário, folha informativa/ consentimento para a recolha da saliva.

Foi criado um questionário com as variáveis que devem ser caracterizadas aquando da recolha da saliva. O questionário será aplicado aos possíveis dadores de amostras biológicas que venham a contribuir para o biobanco.

Os critérios de seleção do dador são:

- Género masculino e feminino
- Crianças e adultos de todas as idades
- Dador interessado e colaborante
- Doação voluntária de amostras de saliva
- Colheita realizada entre as 10 horas e as 12 horas ou entre as 14 horas e as 16 horas
- Preenchimento de um questionário
- Preenchimento da declaração de consentimento informado

Serão rejeitados como dadores os indivíduos que:

- Recusem a doação
- Indivíduos que não se encontram capazes de dar um consentimento eficaz e voluntário

O questionário que acompanha a recolha de saliva inclui questões que abordam:

- Características sociodemográficas
- Medidas antropométricas
- Características socioeconómicas
- Informação de saúde
- Comportamentos e hábitos pessoais
- Hábitos de higiene oral

- Hábitos alimentares
- Hábitos de qualidade de vida/ exercício físico

Foi ainda elaborado um documento informativo onde é referido o objetivo do biobanco, os tipos de investigação a desenvolver, os procedimentos, a identificação das amostras e confidencialidade, comunicação e divulgação dos resultados obtidos, possíveis benefícios para os participantes, riscos físicos previsíveis, participação voluntária e direitos de abandono. Este documento destina-se a esclarecer os dados dos aspetos fundamentais da recolha e utilização não só das amostras mas de toda a informação e é a base de um consentimento informado.

O modelo de consentimento informado foi elaborado tendo em conta a legislação nacional (Lei nº. 12/2005 de 26 de Janeiro). É restrito para os estudos relacionados com a colheita de saliva num biobanco, permitindo a utilização das amostras e dos dados em investigações atuais e futuras.

## 4.2 Avaliação da utilidade da informação recolhida com o questionário para os investigadores.

### 4.2.1 Caracterização do estudo

- Este estudo é do tipo epidemiológico observacional transversal. A recolha de dados foi realizada através da resposta a um questionário aplicado a investigadores que usam saliva como amostra biológica.

### 4.2.2 População alvo

- Investigadores com publicações que usam saliva como amostra biológica.

### 4.2.3 Amostra

- Amostra de 131 elementos que cumpriram os critérios de inclusão na amostra, sendo no entanto obtidos 29 *e-mails* dos 131 enviados.

#### 4.2.4 Processo de amostragem

- Este estudo foi baseado numa revisão sistemática da literatura, com o objetivo de identificar todos os estudos relevantes em que os investigadores usam a saliva como amostra biológica. A investigação foi realizada no banco de dados PubMed utilizando combinações dos termos de busca “saliva sample, biobank or study”. Não foram estabelecidos limites (desenho do estudo, população de estudo, período de tempo, ou o idioma de publicação), a fim de fornecer um conjunto abrangente de resultados. O período de investigação foi de Outubro de 2001 a Abril de 2014, e a busca foi realizada em Abril de 2014.

Na seleção dos artigos/investigadores para o estudo teve-se em conta os seguintes critérios:

Critérios de inclusão:

Investigadores que usam saliva como amostra

Género feminino e masculino

Todos os idiomas

Todo o tipo de população e doença

Todo o tipo de investigação

Investigadores colaborantes

Critérios de exclusão

Recusa na participação do estudo

#### 4.2.5 Questionário

- Desenhou-se um questionário a aplicar aos investigadores onde se avaliou a qualidade e quantidade dos dados recolhidos no questionário da saliva.

#### 4.2.6 Variáveis em estudo no questionário

- Avaliação da quantidade e qualidade da informação presente no questionário da saliva
- Avaliação da associação das amostras salivares com as variáveis introduzidas no questionário

- Utilidade da informação em futuros estudos
- Aquisição de amostras salivares conservadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  cuja informação associada fosse a constante no questionário apresentado.

### 4.3 Instrumentos de colheita e recolha de dados

Para a realização do presente trabalho utilizou-se como instrumentos de recolha de dados um questionário direcionado aos investigadores com publicações indexadas que usam a saliva como amostra. Este questionário pretende avaliar se a informação presente no questionário referente à saliva é ou não suficiente para caracterizar a amostra. Caso o investigador participante considerasse que a informação não seja suficiente foi solicitada a colaboração dos mesmos através de sugestões de variáveis que considerem necessárias.

Um dos objetivos da aplicação dos questionários aos investigadores foi avaliar se seriam capazes de analisar e associar amostras salivares com as variáveis introduzidas no questionário.

Por fim pretendo saber se comprariam amostras salivares conservadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  cuja informação associada estivesse presente no questionário, caso não comprassem gostaria de saber o porquê.

Este questionário foi enviado por correio eletrónico juntamente com uma breve descrição do trabalho de investigação que se encontra em desenvolvimento, onde se explicou o seu objetivo. Pedindo deste modo a colaboração dos investigadores através das respostas às questões sobre a aplicabilidade do questionário que está a ser desenhado. Enviou-se também em anexo o questionário referente à colheita de saliva para observação e apreciação, permitindo depois responder às questões colocadas.

A recolha dos dados e conseqüente análise foi efetuada através das respostas obtidas pelos investigadores via correio eletrónico.

### 4.4 Análise Estatística

- Os dados obtidos foram analisados individualmente, sendo expressas as prevalências calculadas em percentagem.

# *RESULTADOS*



## **V. Resultados**

### 5.1 Questionário para a recolha da saliva

Foi elaborado um questionário específico para a recolha da saliva de modo a obter dados relevantes relacionados com o participante. Este questionário encontra-se na totalidade no anexo A na língua portuguesa e no anexo B na língua inglesa.

Apresenta cinco grupos: Parte I- Caracterização, Parte II- Caracterização da Saúde Geral, Parte III- Saúde e Higiene Oral, Parte IV- Hábitos Alimentares e Parte V- Qualidade de Vida/ Exercício Físico.

A Parte I referente à caracterização contém oito perguntas, entre as quais o género, a idade, o grupo sanguíneo, altura, peso, área de residência, estado civil e habilitações literárias.

A Parte II referente à Caracterização da Saúde Geral contém quinze perguntas, nomeadamente, nos últimos 12 meses foi consultado por um médico e qual a especialidade, data das últimas análises, deteção ou não de valores anormais, toma de antibiótico nos últimos 30 dias e especificação do mesmo, toma de algum medicamento nos últimos 30 dias e especificação do mesmo, presença ou ausência de gravidez no caso das senhoras, data da última menstruação ou fase da menopausa, listagem de doenças a assinalar caso sofra das patologias apresentadas, hipertensão data/ valor máximo e mínimo da última medição, existência de alergia a algum medicamento ou dispositivo médico e referência de qual, submissão a tratamento de radioterapia e quimioterapia incluindo duração do mesmo, consumo de bebidas alcoólicas, hábitos de tabagismo incluindo média de cigarros por dia e idade que começou a fumar e por fim no caso de ex-fumador o tempo decorrido desde que deixou de fumar.

A Parte III referente à Saúde e Higiene Oral contém quinze perguntas, entre as quais, a descrição da saúde oral, número de vezes por dia que realiza a higiene oral, caso não realize a higiene oral indicar o motivo, caso a realize indicar quem normalmente a executa, tempo médio gasto na realização da mesma, utilização de dentífrico, utilização de fio dentário/escovilhão, momentos do dia em que escova os dentes, como realiza a sua higiene oral, alguma vez foi consultado por um médico dentista, histórico de consultas no médico dentista nos últimos 12 meses, motivo da consulta, histórico de doenças da mucosa oral caso existam indicar qual lhe foi diagnosticada, indicar se costuma sentir a boca seca e por fim indicar se acha a consistência da sua saliva normal.

A Parte IV referente aos Hábitos Alimentares contém onze perguntas como, quais as refeições efetuadas diariamente, frequência da ingestão de alimentos fritos, frequência da ingestão de vegetais, frequência da ingestão de fruta, hábitos de alimentação açucarada e frequência de ingestão dos mesmos durante o dia, período do dia em que consome alimentos açucarados, consumo de leite e respetiva frequência, descrição dos alimentos que compõem a dieta normal diária, consumo de bebidas alcoólicas nos últimos 30 dias, consumo e frequência da ingestão de refrigerantes e consumo de café.

A Parte V referente à Qualidade de Vida/ Exercício Físico contém duas perguntas, nomeadamente, a prática de exercício físico e a sua frequência ao longo da semana e os dias da semana que caminha pelo menos 10 minutos contínuos sem interrupção, não incluindo o andar como forma de transporte para ir ou voltar do trabalho.

## 5.2 Folha informativa

Foi elaborado um documento informativo que contém informação esclarecedora sobre a finalidade do biobanco para o dador de amostras biológicas, encontra-se na sua totalidade no Anexo C.

Divide-se em sete tópicos, sendo eles, objetivo da recolha, os procedimentos, a identificação das amostras e confidencialidade, comunicação e divulgação dos resultados obtidos, possíveis benefícios para os participantes, riscos físicos previsíveis, participação voluntária e direitos de abandono.

No **objetivo da recolha** são explicadas as vantagens resultantes da criação de um banco de amostras de saliva. Referindo a importância da colaboração tanto de indivíduos doentes como saudáveis através da doação de amostras de saliva, ajudando deste modo a encontrar novos métodos de tratamento. As diversas potencialidades da saliva são explicadas, a sua contribuição para o conhecimento da biologia oral assim como para o diagnóstico da patologia oral. É também referido que a recolha da saliva é realizada de forma não invasiva não causando desconforto no dador.

Nos **procedimentos** são explicados os passos que a amostra de saliva vai sofrer no caso do dador aceitar participar no biobanco. Sendo que a amostra e as informações clínicas vão estar preservadas e a sua identificação pessoal codificada, sendo esta da responsabilidade do diretor do biobanco.

Também é explicado que a doação da amostra é voluntária e revogável, sendo que o dador ou o seu representante legal tem o direito de retirar a amostra quando achar conveniente, manifestando a sua vontade por escrito sendo a amostra imediatamente destruída. O dador é informado se quer ou não saber os seus resultados, sendo necessário para a obtenção dos mesmos realizar um pedido por escrito para o biobanco e estar expresso no consentimento informado.

Em seguida o dador é informado que a sua participação no biobanco envolve o preenchimento de um questionário simples, uma declaração de consentimento informado, o ser re-contactado pelo biobanco no futuro para responder a mais perguntas e/ou participar numa nova avaliação (sendo esta opcional), concordar que as suas amostras e as suas informações de saúde sejam armazenadas e utilizadas ao longo dos anos, envolve também a compreensão da vasta gama de testes que as amostras vão ser sujeitas sendo impossível prever todos os usos a que as amostras podem ser colocadas nas próximas décadas.

Na **identificação das amostras e confidencialidade** é referida que a confidencialidade dos dados é uma prioridade para o biobanco. Deste modo após a colheita as amostras são identificadas por um código de forma a preservar a privacidade, os dados do processo são fornecidos aos investigadores mas sem qualquer identificação não permitindo saber a quem pertencem. Só podendo ser feita a ligação da amostra ao dador em caso de absoluta necessidade, por motivos de saúde do dador ou a seu pedido. Refere-se também que são tomadas rigorosas medidas de segurança para impedir o uso não autorizado como o controle de acesso, a segurança nos computadores, acordos de confidencialidade e o treino da equipa.

Relativamente à **comunicação e divulgação de dados**, as amostras colhidas para fins de investigação podem ser transferidas para outros centros de investigação mediante a declaração de consentimento informado do participante.

Quanto aos **possíveis benefícios para os participantes**, estes são esclarecidos de que a sua participação é inteiramente voluntária. No caso de um estudo relevante para a saúde do dador este será informado, caso esteja expresso na declaração de consentimento informado.

Os **riscos físicos previsíveis** serão mínimos ou inexistentes, a colheita da saliva é um método simples e rápido realizado de forma não invasiva.

Por fim relativamente à **participação voluntária e direito de abandono** o participante é informado que pode retirar o seu consentimento a qualquer momento, sendo as amostras em seguida destruídas. Sendo a participação voluntária o dador é informado que a sua recusa em não participar não envolve nenhuma penalização ou perda de benefícios.

### 5.3 Declaração de consentimento informado

Encontra-se na sua totalidade no Anexo D.

O consentimento informado contém a identificação do investigador e do doente, este identifica-se com o número do cartão de cidadão/bilhete de identidade, onde refere ter tomado conhecimento e aceitar participar neste projeto contribuindo para a criação de um biobanco de amostras biológicas com informação clínica associada.

Especificamente é pedido ao dador a sua concordância nos seguintes pontos:

- Consinto a colheita de saliva e autorizo a conservação da amostra no biobanco, podendo ser usada em investigações futuras.
- Autorizo a transferência das minhas amostras biológicas, previamente colhidas no âmbito de outros projetos, para outro biobanco, de modo a que possam ser utilizadas em futuras investigações.
- Estou consciente de que minha participação é voluntária e que a qualquer momento posso retirar o meu consentimento, suspendendo a minha participação, sendo as minhas amostras biológicas destruídas em seguida. A recusa em não participar não envolve qualquer penalização ou perda de benefício.
- Quero conhecer os resultados que possam ser relevantes para a minha saúde.
- Autorizo ser contactado pelo biobanco para atualização da minha situação clínica.

Por fim é pedida a assinatura do dador considerando que o mesmo compreendeu a finalidade desta investigação, assim como os possíveis riscos e benefícios associados.

#### 5.4 Questionário para os investigadores

Foi elaborado um questionário aplicado aos investigadores onde se avaliou a qualidade e quantidade dos dados recolhidos no questionário da saliva. Encontra-se na totalidade no anexo E na língua portuguesa e no anexo F na língua inglesa.

Contém quatro perguntas, três delas com uma alínea.

Sendo a primeira pergunta: “Considera a informação presente no questionário suficiente para a realização de um estudo em que pretende analisar amostras salivares?”.

A segunda: “Considera que seria capaz de analisar e associar amostras salivares com as variáveis introduzidas no questionário?”

A terceira “Em estudos futuros acha a informação recolhida importante?”

E por fim a quarta “Compraria amostras salivares conservadas a -80°C cuja informação associada fosse a constante no questionário apresentado?”

Na pergunta 1, 3 e 4 se a resposta do investigador fosse NÃO este era convidado a dar sugestões da informação que achava em falta, ou a sua justificação sugerida.

#### 5.5 E-mail dirigido aos investigadores

Encontra-se na totalidade no anexo G na língua portuguesa e no anexo H na língua inglesa.

O *e-mail* enviado por correio eletrónico continha uma breve descrição do trabalho de investigação que se encontra em desenvolvimento. Nomeadamente a identificação da aluna, a Universidade, a identificação dos professores que coordenam este trabalho e o título do mesmo. Resumidamente indicou-se o motivo deste trabalho, pedindo-se assim colaboração através da resposta às questões sobre a aplicabilidade do questionário que foi desenhado no âmbito da recolha de saliva. Em anexo foi enviado o questionário da saliva para observação e apreciação, permitindo depois responder às questões colocadas no final do *e-mail*. Agradecendo-se por fim a colaboração.

Este *e-mail* foi enviado para 131 investigadores que cumpriam os critérios de inclusão.

Os *e-mails* encontram-se na sua totalidade no anexo I.

## 5.6 Caracterização das respostas

Dos 131 *e-mails* enviados obtive 29 respostas.

A Tabela 1 apresenta a caracterização das respostas obtidas. Observa-se que relativamente à pergunta número 1, 58,6% responderam que SIM e 41,4% responderam que NÃO. Quanto à pergunta 2, 93,1% responderam SIM e apenas 6,9% responderam que NÃO. Pergunta 3, 96,6% responderam SIM e 3,4% responderam que NÃO. Pergunta 4, 72,4% responderam SIM e 27,6 % responderam que NÃO.

**Tabela 1 – Caracterização das respostas**

Perguntas	1- Considera a informação presente no questionário suficiente para a realização de um estudo em que pretende analisar amostras salivares?	2- Considera que seria capaz de analisar e associar amostras salivares com as variáveis introduzidas no questionário?	3- Em estudos futuros acha a informação recolhida importante?	4- Compraria amostras salivares conservadas a - 80°C cuja informação associada fosse a constante no questionário apresentado?
Sim	17	27	28	21
Não	12	2	1	8

## 5.7 Sugestões – Pergunta 1 – Parte I

**Tabela 2 – Sugestões – Pergunta 1 – Parte I**

Pergunta 1	Considera a informação presente no questionário suficiente para a realização de um estudo em que pretende analisar amostras salivares?

<b>Justificações/ Sugestões</b>	Incluir pergunta - Qual a sua etnia?
Parte I – Caraterização	Pergunta 8- Editar para "Quais são as suas habilitações académicas?"

## 5.8 Sugestões – Pergunta 1 – Parte II

Tabela 3 – Sugestões – Pergunta 1 – Parte II

<b>Pergunta 1</b>	<b>Considera a informação presente no questionário suficiente para a realização de um estudo em que pretende analisar amostras salivares?</b>
<b>Justificações/ Sugestões</b>	-Pergunta 3- indicar o valor detetado quer seja alto ou baixo.
Parte II – Caraterização da saúde geral	-Pergunta 9- acrescentar: doença de Alzheimer; obesidade; doença pulmonar; doença da tiróide. - Pergunta 9- além da informação das patologias atuais, adicionar se já tiveram alguma destas patologias no passado (duração, data de ocorrência). - Incluir informação adicional sobre a quimioterapia e radioterapia, (ciclos, duração e frequência). - Doença/ transtorno mental (marcadores salivares). - Indicar o nome do contraceptivo usado e posologia. -Avaliação da dosagem de cortisol salivar, indicar a hora da realização da colheita (fator importante para posterior análise das suas aplicações em situações fisiológicas e patológicas). - Pergunta 13 - reformular as opções dadas (exemplo: 1 copo todos os dias, 2 ou + copos).

## 5.9 Sugestões – Pergunta 1 – Parte III

Tabela 4 – Sugestões – Pergunta 1 – Parte III

<b>Pergunta 1</b>	<b>Considera a informação presente no questionário suficiente para a realização de um estudo em que pretende analisar amostras salivares?</b>
<b>Justificações/ Sugestões</b> Parte III – Saúde e higiene oral	- Pergunta 6- Indicar nome da pasta de dentes utilizada.

## 5.10 Sugestões – Pergunta 1 – Parte IV

Tabela 5 – Sugestões – Pergunta 1 – Parte IV

<b>Pergunta 1</b>	<b>Considera a informação presente no questionário suficiente para a realização de um estudo em que pretende analisar amostras salivares?</b>
<b>Justificações/ Sugestões</b> Parte IV – Hábitos alimentares	- Revisão ao nível dos hábitos alimentares entre o formato “raramente” e as opções mais específicas “todos os dias”.  - Pergunta 8- acrescentar na pergunta: (“Por favor, verifique todas as respostas que se aplicam) ”

## 5.11 Sugestões – Pergunta 1 – Parte V

Tabela 6 – Sugestões – Pergunta 1 – Parte V

<b>Pergunta 1</b>	<b>Considera a informação presente no questionário suficiente para a realização de um estudo em que pretende analisar amostras salivares?</b>
<b>Justificações/ Sugestões</b> Parte V – Qualidade de Vida e Exercício Físico	<ul style="list-style-type: none"><li>- Adicionar mais questões para desportistas ativos.</li><li>- Considerar atividade física rigorosa e atividade física moderada, procurando saber o tempo que dedica a cada uma delas (horas, minutos).</li></ul>

## 5.12 Sugestões – Extra

Tabela 7 – Sugestões – Extra

<b>Pergunta 1</b>	<b>Considera a informação presente no questionário suficiente para a realização de um estudo em que pretende analisar amostras salivares?</b>
<b>Justificações/ Sugestões</b> Extra	<ul style="list-style-type: none"><li>- No questionário sim, porem não é possível ter a certeza sobre a composição salivar sem ver as condições orais. Pois nem todos os pacientes podem responder corretamente e saber tudo sobre as doenças orais.</li><li>- Registrar aparência da saliva.</li><li>- Registrar taxa de fluxo salivar.</li><li>-Verificação das condições pré analíticas antes da colheita - tempo decorrido antes da escovagem ou da ingestão de sólidos/líquidos.</li><li>- Método de recolha da saliva passiva ou ativa.</li></ul>

### 5.13 Sugestões – Pergunta 2

Tabela 8 – Sugestões – Pergunta 2

<b>Pergunta 2</b>	<b>Considera que seria capaz de analisar e associar amostras salivares com as variáveis introduzidas no questionário?</b>
<b>Justificações/ Sugestões</b>	- Necessária verificação das condições orais.

### 5.14 Sugestões – Pergunta 3

Tabela 9 – Sugestões – Pergunta 3

<b>Pergunta 3</b>	<b>Em estudos futuros acha a informação recolhida importante?</b>
<b>Justificações/ Sugestões</b>	-Os questionários são normalmente construídos de acordo com um estudo específico, assim podia-se eliminar certas variáveis e fatores de confusão. -Um biobanco com estas informações associadas seria muito valioso.

## 5.15 Sugestões – Pergunta 4

Tabela 10 – Sugestões – Pergunta 4

<b>Pergunta 4</b>	<b>Compraria amostras salivares conservadas a -80°C cuja informação associada fosse a constante no questionário apresentado?</b>
<b>Justificações/ Sugestões</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>-Custo da amostra, apesar de conter potencial de comercialização.</li><li>- Dependente do método de colheita e do armazenamento da amostra.</li><li>- Necessidade de saber se determinado biomarcador para determinada doença em estudo estava ou não presente numa determinada população.</li><li>- Absoluta certeza das condições orais dos pacientes de forma a poder confiar nas variáveis de análise na saliva.</li><li>- Maior interesse no fornecimento de ADN com dados associados uma vez que assim as amostras teriam maior tempo de vida.</li><li>- Preferência por amostras de ADN extraído da saliva a amostras de saliva.</li><li>-Este tipo de amostras seriam úteis como dados de controlo, mas isso exige provas rigorosas de que as amostras sejam de adultos, sem hábitos de tabagismo e sem doenças crónicas.</li></ul>



*DISCUSSÃO*



## **VI. Discussão**

### 6.1 Discussão do questionário para a recolha de saliva

#### 6.1.1 Grupo I

Relativamente ao grupo I do questionário referente à saliva, na maioria dos estudos, a população de interesse é descrita em termos das suas características sociodemográficas (género e idade) <sup>(98)</sup>. Estas variáveis podem ser o principal objetivo de interesse ou podem apresentar-se como controlo na análise da relação entre outras variáveis. Outras variáveis também comuns nestes estudos são: grupo sanguíneo, índice de massa corporal, área de residência, estado civil e habilitações literárias <sup>(99)</sup>. O significado e a importância de variáveis como a idade e o sexo nos dados epidemiológicos podem ser um indicador de um estágio biológico ou um processo histórico ou psicossocial. A importância social da idade cronológica pode variar de acordo com o tempo e o género; e a relação entre a idade cronológica, social ou psicológica pode também variar historicamente e culturalmente. O género é analisado de acordo com aspetos biológicos (composição corporal), culturais e sociais (divisão do trabalho em varias culturas), psicológicos e comportamentais. A área de residência e as habilitações literárias estão associadas com a probabilidade de os hábitos alimentares e os hábitos de higiene oral serem os mais adequados. A variável sociodemográfica estado civil pode ser usada em seu próprio sentido (pessoas casadas costumam ter melhores hábitos alimentares do que as solteiras). O significado e a importância do estado civil varia de acordo com a idade e o sexo <sup>(98)</sup>. Motivo que levou à inclusão destas variáveis na primeira parte do questionário geral sobre a saliva, caracterização.

#### 6.1.2 Grupo II

Na parte II deste questionário, a inserção da data das últimas análises realizadas, assim como a deteção de valores anormais é um parâmetro que se apresenta útil. Polimeni A *et al.*, refere que existem vários artigos que avaliam a concentração de glicose na saliva em pacientes diabéticos, e apenas uma minoria se concentra em pacientes saudáveis com o propósito de investigar se os níveis de glicose variam de acordo com a escovagem e os hábitos nutricionais, avaliados em diferentes tempos durante o dia <sup>(101)</sup>. Quando a amostra é colhida antes de escovar os dentes verificamos que durante a noite, quando a taxa de fluxo salivar é reduzida, os níveis de glicose nos fluidos orais aumentam e

provavelmente acumulam-se nos tecidos duros e moles da boca. Quando se escovam os dentes antes da colheita demonstra-se a importância da higiene oral eficaz na redução do nível de glicose na cavidade oral <sup>(101)</sup>.

Uso de medicação e salivação, todas as drogas que interferem com o sistema nervoso central e periférico, independentemente do seu fim, apresentam influência sobre a produção de saliva. Estes efeitos podem ser tanto hipersalivação ou hipossalivação. Ambos os fenômenos são fontes de desconforto. Dor, alterações de sabor e halitose são efeitos colaterais apresentados de certos tipos de medicação <sup>(102)</sup>. Os fármacos bloqueadores do sistema nervoso provocam redução do fluxo salivar como efeito colateral. Para evitar as doenças da cavidade oral e o desconforto, as medidas de higiene oral em doentes a tomar este tipo de medicação devem ser cautelosas. Devendo os pacientes ser instruídos a ter as medidas mais corretas de higiene oral, a fim de evitar infecções da mucosa oral. Para aumentar a taxa de fluxo salivar, é necessário aumentar a quantidade de neurotransmissores acetilcolina e noradrenalina. Estes são degradados muito rapidamente pelo corpo provocando a secreção de um elevado volume de saliva. As glândulas salivares podem sofrer alterações morfológicas, alguns medicamentos são capazes de provocar hipertrofia das glândulas salivares. Tais como o dobutamina e prenalterol, causando hiperplasia das glândulas salivares. A medição das drogas na saliva apresenta interesse tanto para fins de monitorização terapêutica como para a detecção do uso de drogas ilícitas <sup>(102)</sup>.

Relativamente à pergunta sobre a gravidez, alguns estudos clínicos têm demonstrado que os tecidos orais podem ser afetados. Alterações relacionadas com a gravidez são mais frequentes e mais acentuadas no tecido gengival. O número de microrganismos salivares cariogênicos pode aumentar durante a gravidez, em simultâneo com uma diminuição no pH salivar e no efeito tampão. Mudanças na composição salivar no final da gravidez e durante a lactação pode predispor temporariamente à cárie e à erosão <sup>(103)</sup>.

O desconforto oral é encontrado em muitas mulheres na menopausa. Os principais sintomas incluem boca seca e glossodinia que, por sua vez, pode aumentar a ocorrência de doenças orais, como a candidíase <sup>(104)</sup>.

Ao nível das doenças que possam afetar os dadores de saliva temos a doença cardíaca, a diabetes, as doenças infecto-contagiosas, a epilepsia entre outras.

Relativamente às doenças cardiovasculares, a inflamação tem sido identificada como a causa subjacente da aterosclerose, condição associada com a deposição de lípidos no revestimento das artérias levando progressivamente ao enfarto agudo do miocárdio.

Segundo Ptaffe as pessoas com maiores concentrações de proteína C-reativa no sangue são suscetíveis a desenvolver doenças cardiovasculares <sup>(41)</sup>. Christodoulides *et al.* demonstrou que é possível detetar a proteína C-reativa na saliva. A presença de moléculas da proteína na saliva proporciona uma oportunidade para o desenvolvimento de avaliações não invasivas do risco de DCV <sup>(105)</sup>.

Streckfus C, *et al.*, <sup>(106)</sup> desenvolveu um método para medir as biomoléculas na saliva para deteção do cancro da mama. O teste de saliva não se destina a substituir os testes de rastreio do cancro da mama apresentando-se porém um suplemento valioso para estes métodos de triagem estabelecidos.

Sabe-se que o fluxo salivar em pacientes com diabetes mellitus é reduzido. A medicação normal utilizada nestes pacientes também pode ser responsável pela diminuição da taxa de fluxo salivar <sup>(102)</sup>.

Em pacientes com epilepsia, a tomar fenitoína, pode ser observado hipertrofia gengival, devido a um aumento na síntese de colagénio e acúmulo de proteoglicanos <sup>(102)</sup>. Anticorpos anti-HIV são detetáveis no fluido oral. Dentro das manifestações orais presentes em indivíduos HIV positivos, a xerostomia aparece como uma das mais frequentes, podendo levar a uma redução na qualidade de vida. O papel da saliva é de grande importância na manutenção da saúde da cavidade oral. Alterações na quantidade e na qualidade da saliva, incluindo a diminuição das propriedades antimicrobianas, levam ao rápido avanço da cárie dentária e da doença periodontal <sup>(102)</sup>.

Os testes de saliva comercializados podem ser usados na deteção de anticorpos para HIV e para determinar os níveis de estrogénio, álcool e drogas ilícitas.

Estudos têm demonstrado que o teste da saliva para os anticorpos HIV, é a mais conhecida das ferramentas de diagnóstico à base da saliva, aproximando-se da sensibilidade e especificidade de um teste de sangue <sup>(41)</sup>.

O questionário desenhado contém referência aos valores da hipertensão, e à possível alergia a medicamentos ou dispositivos médicos para uma melhor caracterização das

condições de saúde do dador. Contem também uma pergunta referente ao tratamento de quimioterapia e radioterapia, incluindo a duração do tratamento.

Na saliva encontra-se a proteína mucina presente nas secreções mucosas, desempenhando um papel importante na lubrificação da mucosa oral. Dijkema T, investigou os níveis da mucina na saliva de modo a entender as denúncias de boca seca após 12 meses de radioterapia. Tendo o estudo concluído uma tendência generalizada para níveis mais baixos da mucina na saliva em pacientes com xerostomia severa após 12 meses de radioterapia <sup>(107)</sup>.

O consumo de álcool afeta a mucosa oral indiretamente pela alteração das glândulas salivares. A morfologia e a função destas estruturas encontram-se alteradas em função da ingestão crônica de álcool, o que inclui aumento do volume das glândulas em função de uma fibrose e infiltração gordurosa, bem como diminuição do fluxo salivar. O álcool provoca uma diminuição das prostaglandinas, que normalmente atuam estimulando o fluxo salivar <sup>(108)</sup>.

O fumo do cigarro contém radicais livres, que podem danificar os tecidos. A saliva contém uma secreção mucosa para proteger as células epiteliais dos desafios mecânicos e químicos. Taniguchi M, concluiu que a saliva de fumadores, especialmente a saliva estimulada, contém significativamente mais proteínas oxidadas com aumento de pontes dissulfeto, que reduz a proteção do epitélio oral <sup>(109)</sup>.

### 6.1.3 Grupo III

Relativamente à terceira parte do questionário, saúde e higiene oral, as perguntas inseridas são de caracterização da saúde oral dos participantes, desde a sua auto-percepção da sua saúde oral, o número de vezes que realiza a sua higiene oral, o tempo gasto na sua realização, o momento de escovagem, o uso de dentífrico, fio dentário, última consulta no médico dentista e motivo da mesma, histórico de doenças da cavidade oral e sensação de boca seca.

Segundo Oberoi SS *et al.*, as doenças orais constituem um problema de saúde pública nos países em desenvolvimento devido à sua alta prevalência. Apresentando um impacto negativo sobre a qualidade de vida dos indivíduos afetados. As doenças orais podem afetar negativamente a concentração, o relacionamento interpessoal e a produtividade devido à íntima relação entre saúde oral e saúde geral. A prevenção da

doença oral pode ser alcançada por meio da otimização das práticas de saúde oral, escovagem adequada dos dentes, uso de fio dentário, visitas ao dentista em intervalos regulares, e práticas alimentares adequadas <sup>(110)</sup>. A síndrome da boca ardente é uma condição clínica incapacitante, as suas características incluem sensação de queimadura dolorosa na boca, sendo a língua o local mais acometido, podendo haver sensação dolorosa também nas gengivas, lábios e mucosa jugal. Frequentemente associada a disgeusia e xerostomia. A etiologia é multifatorial, e as condições clínicas associadas incluem distúrbios gastrointestinais, urogenitais, psiquiátricos, neurológicos e metabólicos, assim como reações a drogas <sup>(102)</sup>.

#### 6.1.4 Grupo IV

No que se refere à quarta parte do questionário, hábitos alimentares, as perguntas apresentadas visam uma melhor caracterização dos hábitos do dador em estudo.

Incluindo as refeições diárias realizadas, a ingestão de alimentos fritos, vegetais, fruta, alimentos açucarados, ingestão de leite, bebidas alcoólicas, refrigerantes e café. A cavidade oral é um meio com um PH aproximadamente neutro (PH=7) porém ao longo do dia sofre alterações, de acordo com a alimentação. Os alimentos ingeridos capazes de reduzir o PH do meio oral podem provocar desmineralização dentária. A saliva apresenta um papel protetor no que se refere ao processo de desmineralização do esmalte <sup>(111)</sup>.

Dados científicos e epidemiológicos sugerem uma correlação contínua entre a nutrição e a integridade da cavidade oral. A combinação de um elevado consumo de hidratos de carbono e a não inclusão de flúor está associada com o aumento da incidência de cárie dentária, ocorrendo redução da quantidade de saliva. Assim, os alimentos que contêm entre 15 e 20% de açúcares, especialmente sacarose, são os mais cariogênicos, particularmente se consumidos entre as refeições. O xilitol não é cariogênico, podendo ter um efeito anti-cárie à medida que aumenta o fluxo de saliva, aumentando o pH e reduzindo os níveis de *Streptococcus mutans*. A má nutrição pode afetar o desenvolvimento da cavidade oral e a progressão das doenças orais através da redução da resistência aos biofilmes microbianos reduzindo a capacidade de reparação do tecido oral <sup>(111)</sup>.

As relações mais comuns entre a saúde oral e as deficiências nos hábitos alimentares envolvem a frequência da ingestão de açúcar e hidratos de carbono, a deficiência de

ferro, vitamina B12 e ácido fólico associados a patologias da mucosa oral. Uma pobre saúde oral pode ter impacto indireto na saúde sistémica através de distúrbios na ingestão nutricional. A função oral deficiente devido ao edentulismo, às próteses mal ajustadas e às doenças orais, compromete a nutrição global através das diferentes escolhas alimentares assim como a preparação dos alimentos. Ao diminuir a eficiência mastigatória, algumas pessoas evitam alimentos difíceis de mastigar, como a carne, a cenoura, o pão duro. Pessoas com má saúde oral podem sofrer de deficiência na ingestão de frutas e legumes, fibras e outros nutrientes essenciais <sup>(111)</sup>.

### 6.1.5 Grupo V

Na V parte referente à qualidade de vida/ exercício físico, incluíram-se questões referentes à prática de exercício físico e à sua frequência. Segundo Walsh NP, *et al.*, a prática de atividade física tem implicações na formação da saliva e nas suas propriedades, nomeadamente a diminuição da concentração de imunoglobulina A, primeira linha de defesa contra os vírus potencialmente patogénicos. A prática de exercício físico conduz a uma alteração do fluxo salivar, estimula o sistema nervoso simpático o que desencadeia vasoconstrição nas arteríolas que irrigam as glândulas salivares levando a uma diminuição do fluxo salivar. Ao praticar desporto existe perda de água por evaporação contribuindo para a desidratação. A estimulação das glândulas salivares leva a um aumento do conteúdo proteico da saliva, uma vez que ocorre aumento dos níveis plasmáticos de cortisol e lactato, existindo também alteração na composição iónica da saliva, aumento de sódio e potássio <sup>(100)</sup>.

## 6.2 Discussão das respostas obtidas dos investigadores

### 6.2.1 Pergunta nº1

Relativamente à caracterização das respostas obtidas pelos investigadores a tabela 1 indica-nos que de acordo com a questão nº1, 17 investigadores concordaram com a informação contida no questionário e 12 investigadores sugeriram novas questões, ou reformulações das questões existentes. Quanto às sugestões dadas, a inserção de uma nova pergunta referente à etnia é uma mais-valia para uma melhor caracterização da população em estudo sobretudo em populações em que se preveja que haja várias etnias presentes. Particularmente na epidemiologia, a categoria etnia é frequentemente

utilizada como variável de exposição na saúde ou nos marcadores de posição social, especialmente na investigação sobre os determinantes sociais <sup>(112)</sup>.

Relativamente ao grupo II, além da indicação do valor anormal detetado nas análises, a colocação por extenso do valor quer se encontre mais alto ou mais baixo que a norma, é útil na avaliação da saúde do dador. No entanto parece-nos pouco provável que o dador tenha presente os valores concretos dos parâmetros avaliados. Na pergunta 9 de modo a completar as patologias apresentadas foi sugerido a inclusão da doença de Alzheimer, obesidade, doença pulmonar, doença da tiróide e doença mental pois estas patologias podem afetar o fluxo salivar. A criação de uma nova pergunta onde se questiona o dador se já tinha tido alguma das patologias indicadas ou outras no passado (data de ocorrência e duração) apresenta-se útil para uma melhor caracterização da sua condição física. Além da especificação do nome do fármaco, foi sugerido indicar também a sua posologia. Na pergunta relativa ao tratamento de radioterapia ou quimioterapia foi sugerido acrescentar informação específica como, o número de ciclos, a duração e a frequência. Dijkema T *et al.*, refere que são necessários mais parâmetros qualitativos, como os níveis de mucina na saliva para uma investigação mais aprofundada sobre a xerostomia induzida pela radioterapia. Dijkema T *et al.*, num estudo mostrou uma tendência para níveis mais baixos de mucina na saliva em pacientes com xerostomia severa <sup>(107)</sup>. Outro tópico sugerido foi a avaliação da dosagem de cortisol salivar, indicando a hora da realização da colheita. De acordo com Groschl M., o cortisol é uma substância frequentemente investigada na saliva, é um hormona que atua aumentando a taxa de gluconeogénese durante o *stress*. A sua colheita não invasiva, torna-se popular no uso em investigações psicológicas. Na ampla variedade de estudos existe consenso que o cortisol salivar aumenta drasticamente sob *stress* crónico, como mostrado nas vítimas que enfrentam situações de risco de vida, em pessoas socialmente isoladas ou desfavorecidas, assim como em pacientes que sofrem de depressão <sup>(49)</sup>. Na pergunta 13, a reformulação das opções para 1 copo todos os dias, 2 ou mais copos por dia elimina o viés da resposta.

Na parte III do questionário foi sugerido na pergunta 6, indicar o nome da pasta de dentes utilizada, uma vez que cada pasta tem a sua constituição, o que pode alterar o conteúdo da secreção salivar.

Na parte IV foi sugerido nas perguntas 2, 3 e 4 uma revisão entre o formato “raramente” e as opções mais específicas como “todos os dias”, de modo a eliminar o viés de informação. Optou-se pela utilização das alíneas: nunca, 1 dia por semana, 2 dias por semana, 2 ou mais dias por semana, todos os dias. Assim como na pergunta 8 acrescentar: “Por favor, verifique todas as respostas que se aplicam”, uma vez que a dieta normal não é unicamente formada por um alimento.

As sugestões para a parte V visam considerar dois tipos de atividade física, atividade física rigorosa e atividade física moderada, dentro destes dois tipos saber qual a sua prática e o tempo que dedica a cada uma delas. Segundo Walsh NP, *et al.*, em geral, os adultos saudáveis podem produzir 500-1500 mL de saliva por dia, a uma taxa de cerca de 0,5 mL/min, mas várias condições fisiológicas e patológicas podem modificar a produção de saliva, quantitativa e qualitativamente. Sendo que o exercício físico pode estimular a produção e secreção de saliva <sup>(100)</sup>.

Foram referidas sugestões que não se enquadravam no questionário em si, mas sim na criação de um questionário ou folha informativa a preencher pelo médico que recolhe a saliva. Esta consistiria numa avaliação das condições orais do indivíduo, uma vez que nem todos os pacientes podem responder e saber todas as doenças orais existentes. Seria também registado a aparência da saliva, assim como a taxa de fluxo salivar. Noutro tópico seria registado o método de recolha da saliva, ativa ou passiva. E por fim seriam registadas as condições pré analíticas antes da colheita, tempo decorrido antes da escovagem ou da ingestão de sólidos/líquidos.

### 6.2.2 Pergunta nº2

De acordo com a tabela 1 na questão nº2, 27 investigadores consideravam-se capazes de analisar e associar amostras salivares com as variáveis introduzidas no questionário e apenas 2 não se consideravam capazes. A justificação dada remete para a importância da verificação das condições orais.

### 6.2.3 Pergunta nº3

De acordo com a tabela 1 na questão nº3, 28 investigadores acham a informação recolhida importante em estudos futuros (sugerindo que um biobanco com estas informações associadas seria muito valioso), porém um investigador não concorda

referindo que normalmente os questionários são construídos de acordo com um estudo específico, podendo-se eliminar variáveis e fatores de confusão. Contudo o objetivo deste trabalho foi criar um questionário que abrangesse o maior número de informação possível para se tratar juntamente com a amostra de saliva doada, podendo vir a ser utilizado em diversos estudos/ patologias que não estariam necessariamente definidos aquando da colheita.

#### 6.2.4 Pergunta nº4

Relativamente à pergunta nº4 a tabela 1 indica-nos que, 21 investigadores compravam amostras salivares conservadas a -80°C cuja informação associada fosse a constante no questionário apresentado. Já 8 investigadores não compravam as amostras. A questão mais abordada foi o custo da amostra e o método de colheita/ armazenamento, apresentando-se estes fatores determinantes na compra da amostra.

A necessidade de saber, se um biomarcador para determinada doença em estudo estava ou não presente na população também foi abordada. Segundo Lee *et al.*, os diagnósticos baseados na saliva devem cumprir dois pré-requisitos, a descoberta de biomarcadores para as diferentes doenças entre os componentes presentes saliva, e os avanços na sensibilidade e especificidade dos biomarcadores através do desenvolvimento de novas tecnologias<sup>(113)</sup>.

Mais uma vez é referida a importância da certeza absoluta das condições orais dos pacientes de forma a poder confiar nas variáveis de análise na saliva.



*CONCLUSÃO*



## **VII. Conclusão**

### 7.1 Conclusões gerais

- Com este estudo podemos perceber que através dos avanços tecnológicos e laboratoriais, a saliva deixou de ter uma aplicação exclusiva à detecção das características relacionadas com a saúde oral, passando a poder ser aplicada como marcador do estado de saúde geral do indivíduo.
- A existência de amostras tanto de dadores saudáveis como de doentes, a presença de mais do que uma amostra do mesmo dador e a disponibilização da informação clínica dos mesmos, representa um recurso fundamental na identificação de novos testes de diagnóstico e prognóstico, bem como de medicamentos inovadores.
- A saliva através dos testes de diagnóstico salivares apresenta uma abordagem económica tanto para o rastreio individual como para o rastreio de grandes populações.
- 58,6% dos investigadores consideraram a informação presente no questionário referente à saliva, suficiente para a realização de um estudo em que se pretende analisar amostras salivares.
- Relativamente à capacidade de analisar e associar amostras salivares com as variáveis introduzidas no questionário 93,1% consideram-se capazes de o fazer.
- Em estudos futuros 96,6% dos investigadores acham a informação recolhida importante.
- Sendo que 72,4% compravam amostras salivares conservadas a -80°C cuja informação associada fosse a constante no questionário desenvolvido. O custo da amostra e o método de colheita/ armazenamento foram os principais motivos referidos para os 27,6 % que responderam que não.

### 7.2 Limitações

A amostra inicial seleccionada foi de 131 investigadores, porém só obtivemos resposta de 29. Sendo que a contribuição dada na avaliação qualitativa e quantitativa da informação presente no questionário foi reduzida.

Necessidade de uma maior aderência para um melhor desenvolvimento do tema em estudo.

### 7.3 Aplicações/ Sugestões

O próximo passo terá que passar pelo processo de validação do questionário construído neste estudo junto dos biobancos. Este processo de validação passa pela sua aplicação numa amostra representativa de uma população específica para estudo complementada com a recolha de saliva dos participantes.

Este questionário, numa próxima fase, deve ser utilizado como um instrumento útil e complementar na análise das características salivares existentes no biobanco referente aos indivíduos em estudo. A investigação em saúde exige o máximo de conhecimentos sobre a população em estudo de modo a tirar conclusões fiáveis permitindo orientar estratégias em saúde da forma mais correta e eficaz possível.

## *BIBLIOGRAFIA*



## VIII. Bibliografia

1. *Lei nº12/2005, "Informação genética e Informação de Saúde", in DR série I-A. 26 de Janeiro de 2006. 606-611.*
2. Zielhuis, G.A., *Biobanking for epidemiology*. Public Health, 2012. 126(3): p. 214-6.
3. Shankar, S., Uday, Y., *Biobanking: Basic concepts and role in rheumatology*. Indian Journal of Rheumatology, 2011. 6(3): p. 129-137.
4. Sak, J., et al., *Population biobanking in selected European countries and proposed model for a Polish national DNA bank*. J Appl Genet, 2012. 53(2): 159-65
5. Harris JR, Burton P, Knoppers BM, Lindpaintner K, Bledsoe M, Brookes AJ. et al. *Toward a roadmap in global biobanking for health*. Eur J Hum Genet. 2012 Nov;20(11):1105-11
6. Budimir D, Polasek O, Marusić A, Kolčić I, Zemunik T, Boraska V, et al. *Ethical aspects of human biobanks: a systematic review*. Croat Med J, 2011. 52(3): 262-79.
7. Kelley K, Stone C, Manning A, Swede H. et al. *Population-Based Biobanks and Genetics Research in Connecticut*. By The Virtual Office of Genomics, 2007
8. Hirtzlin I, Dubreuil C, Préaubert N, Duchier J, Jansen B, Simon J, et al. *An empirical survey on biobanking of human genetic material and data in six EU countries*. Eur J Hum Genet. 2003 Jun;11(6):475-88.
9. Yuille M, Dixon K, Platt A, Pullum S, Lewis D, Hall A, et al. *The UK DNA banking network: a "fair access" biobank*. Cell Tissue Bank. 2010 Aug;11(3):241-51.
10. Riegman PH, Morente MM, Betsou F, de Blasio P, Geary P. *Biobanking for better healthcare*. Mol Oncol. 2008 Oct;2(3):213-22.
11. Willemsen G, de Geus EJ, Bartels M, van Beijsterveldt CE, Brooks AI, Estourgie-van Burk GF. *The Netherlands Twin Register Biobank: A Resource for Genetic Epidemiological Studies*. Twin Res Hum Genet. 2010 Jun;13(3):231-45.
12. Maschke KJ. *Navigating an ethical patchwork—human gene banks*. Nat Biotechnol. 2005 May;23(5):539-45.

13. Eriksson S, Helgesson G. Potential harms, anonymization, and the right to withdraw consent to biobank research.. *Eur J Hum Genet.* 2005 Sep;13(9):1071-6.
14. Hansson MG. The need to downregulate: a minimal ethical framework for biobank research. *Methods Mol Biol.* 2011;675:39-59.
15. Cambon-Thomsen A, Rial-Sebbag E, Knoppers BM. Trends in ethical and legal frameworks for the use of human biobanks.. *Eur Respir J.* 2007 Aug;30(2):373-82.
16. Hansson MG, Dillner J, Bartram CR, Carlson JA, Helgesson G. Should donors be allowed to give broad consent to future biobank research? *Lancet Oncol.* 2006 Mar;7(3):266-9.
17. Salvaterra E, Lecchi L, Giovanelli S, Butti B, Bardella MT, Bertazzi PA, et al. Banking together. A unified model of informed consent for biobanking. *EMBO Rep.* 2008 Apr;9(4):307-13.
18. Knoppers BM. Biobanking: international norms. *J Law Med Ethics.* 2005 Spring;33(1):7-14
19. Beskow LM, Friedman JY, Hardy NC, Lin L, Weinfurt KP. *Developing a simplified consent form for biobanking.* *PLoS One,* 2010. 5(10): e13302.
20. Hoeyer K. Donors perceptions of consent to and feedback from biobank research: time to acknowledge diversity? *Public Health Genomics.* 2010;13(6):345-52.
21. Alonso M A, Iglesias FJ, Castelló J C, Grande L F, Carranza J H, Gutiérrez J J, Alonso, M.A., et al., *Recomendaciones sobre los aspectos éticos de las colecciones de muestras y bancos de materiales humanos con fines de investigación biomédica.* *Rev Esp Salud Publica.* 2007 Mar-Apr;81(2):95-111.
22. *2012 Best Practices for Repositories- Collection, Storage, Retrieval, and Distribution of Biological Materials for Research.* 2012. Biopreserv Biobank. 2012 Apr;10(2):79-161.
23. Caulfield T, McGuire AL, Cho M, Buchanan JA, Burgess MM, Danilczyk U, et al. Research ethics recommendations for whole genome research: consensus statement. *PLoS Biol.* 2008 Mar 25;6(3):e73.
24. Yuille M, van Ommen GJ, Bréchet C, Cambon-Thomsen A, Dagher G, Landegren U, et al. Biobanking for Europe. *Brief Bioinform.* 2008 Jan;9(1):14-24.
25. Peakman T, Elliott P: Current standards for the storage of human samples in biobanks. *Genome Med.* 2010 Oct 5;2(10):72

26. Elliott P, Peakman T: The UK Biobank sample handling and storage protocol for the collection, processing and archiving of human blood and urine. *Int J Epidemiol.* 2008 Apr;37(2):234-44.
27. Peakman TC, Elliott P: The UK Biobank sample handling and storage validation studies. *Int J Epidemiol* 2008, Apr;37 Suppl 1:i2-6
28. Cambon-Thomsen A. The social and ethical issues of post-genomic human biobanks. *Nat Rev Genet.* 2004 Nov;5:866-73.
29. Greely HT. The uneasy ethical and legal underpinnings of large-scale genomic biobanks. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2007;8:343-64.
30. Kaufman DJ, Murphy-Bollinger J, Scott J, Hudson KL. Public opinion about the importance of privacy in biobank research. *Am J Hum Genet.* 2009 Nov; 85(5):643-54.
31. Council of Europe. Recommendation of the Committee of Ministers to Member States on Research on Biological Material of Human Origin. Strasbourg, 2006.
32. Hewitt, R.E., *Biobanking: the foundation of personalized medicine.* *Curr Opin Oncol*, 2011 Jan; 23(1): 112-9.
33. Gibbons SM, Kaye J. Governing genetic databases: collection, storage and use. *Kings Law J.* 2007; 18(2): 201–208.
34. Meltzer LA. Undesirable implications of disclosing individual genetic results to research participants. *Am J Bioeth.* 2006 Nov-Dec;6(6):28-30
35. Murphy J, Scott J, Kaufman D, Geller G, LeRoy L, Hudson K. Public expectations for return of results from large-cohort genetic research.. *Am J Bioeth.* 2008 Nov;8(11):36-43.
36. Knoppers BM, Joly Y, Simard J, Durocher F. The emergence of an ethical duty to disclose genetic research results: International perspectives. *Eur J Hum Genet.* 2006 Nov;14(11):1170-8.
37. Partridge AH, Burstein HJ, Gelman RS, Marcom PK, Winer EP. Do patients participating in clinical trials want to know study results? *J Natl Cancer Inst.* 2003 Mar 19;95(6):491-2.
38. Bookman EB, Langehorne AA, Eckfeldt JH, Glass KC, Jarvik GP, Klag M, et al. Reporting genetic results in research studies: Summary and recommendations of an NHLBI working group. *Am J Med Genet A.* 2006 May 15;140(10):1033-40.
39. Asai A, Ohnishi M, Nishigaki E, Sekimoto M, Fukuhara S, Fukui T. Attitudes of the Japanese public and doctors towards use of archived information and samples without informed consent: Preliminary findings based on focus group

- interviews. *BMC Medical Ethics* Jan 9;2002 3:E1. *BMC Med Ethics*. 2002 Jan 9;3:E1.
40. Royal College of Physicians Committee on Ethical Issues in Medicine: Research based on archived information and samples. Recommendations from the Royal College of Physicians Committee on ethical issues in medicine. *J R Coll Physicians Lond* 1999 May-Jun;33(3):264-6.
  41. Pfaffe T, Cooper-White J, Beyerlein P, Kostner K, Punyadeera C. Diagnostic Potential of Saliva: Current State and Future Applications. *Clin Chem*. 2011 May;57(5):675-87.
  42. Schafer CA, Schafer JJ, Yakob M, Lima P, Camargo P, Wong DT. Saliva diagnostics: utilizing oral fluids to determine health status. *Monogr Oral Sci*. 2014;24:88-98.
  43. Kaufman E, Lamster IB. The diagnostic applications of saliva: a review. *Crit Rev Oral Biol Med* 2002;13(2):197–212.
  44. Christodoulides N, Mohanty S, Miller CS, Langub MC, Floriano PN, Dharshan P, et al. Application of microchip assay system for the measurement of C-reactive protein in human saliva. *Lab Chip* 2005 Mar;5(3):261-9.
  45. Kaufman E, Lamster IB. Analysis of saliva for periodontal diagnosis: a review. *J Clin Periodontol* 2000 Jul;27(7):453– 65.
  46. Floriano PN, Christodoulides N, Miller CS, Ebersole JL, Spertus J, Rose BG, et al. Use of salivabased nano-biochip tests for acute myocardial infarction at the point of care: a feasibility study. *Clin Chem*. 2009 Aug;55(8):1530-8.
  47. Carpenter GH. The secretion, components, and properties of saliva. *Annu Rev Food Sci Technol*. 2013;4:267-76.
  48. Zolotukhin S. Metabolic hormones in saliva: origins and functions. *Oral Dis*. 2013 Apr;19(3):219-29.
  49. Groschl M., Current Status of Salivary Hormone Analysis. *Clin Chem*. 2008 Nov;54(11):1759-69.
  50. Rehak NN, Cecco SA, Csako G. Biochemical composition and electrolyte balance of “unstimulated” whole human saliva. *Clin Chem Lab Med*. 2000 Apr; 38(4):335–43.
  51. Li Y, St John MA, Zhou X, Kim Y, Sinha U, Jordan RC, et al. Salivary transcriptome diagnostics for oral cancer detection.. *Clin Cancer Res*. 2004 Dec 15;10(24):8442-50.
  52. Hu S, Wang J, Meijer J, Jeong S, Xie Y, Yu T, et al. Salivary proteomic and genomic biomarkers for primary Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum*. 2007 Nov;56(11):3588-600.

53. Hart TC, Corby PM, Hauskrecht M, Ryu OH, Pelikan R, Valko M, et al.. Identification of Microbial and Proteomic Biomarkers in Early Childhood Caries. *International Journal of Dentistry*. 2011, Article ID 196721, 13 pages.
54. Reyes CP, Dalmacio LM. Bacterial Diversity in the Saliva and Plaque of Caries-free and Caries-active Filipino Adults. *Philippine Journal of Science*. 2012; 141 (2): 217-227.
55. Hoeyer K, Olofsson BO, Mjorndal T, Lynöe N. Informed consent and biobanks: a population-based study of attitudes towards tissue donation for genetic research. *Scand J Public Health*. 2004;32(3):224-9.
56. Kettis-Lindblad A, Ring L, Viberth E, Hansson MG. Genetic research and donation of tissue samples to biobanks. What do potential sample donors in the Swedish general public think? *Eur J Public Health*. 2006;16(4):433-40.
57. Secko DM, Preto N, Niemeyer S, Burgess MM. Informed consent in biobank research: a deliberative approach to the debate. *Soc Sci Med*. 2009 Feb;68(4):781-9.
58. Longstaff H, Burgess MM. Recruiting for representation in public deliberation on the ethics of biobanks. *Public Underst Sci*. 2010 Mar;19(2):212-24.
59. O'Doherty KC, Hawkins A. Structuring public engagement for effective input in policy development on human tissue biobanking. *Public Health Genomics*. 2010;13(4):197-206
60. Hens K, Nys H, Cassiman JJ, Dierickx K. Genetic research on stored tissue samples from minors: a systematic review of the ethical literature. *Am J Med Genet A*. 2009 Oct;149A(10):2346-58.
61. Kaufman D, Geller G, Leroy L, Murphy J, Scott J, Hudson K. Ethical implications of including children in a large biobank for genetic-epidemiologic research: a qualitative study of public opinion.. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 2008 Feb 15;148C(1):31-9.
62. Levenson D. When should pediatric biobanks share data? *Am J Med Genet A*. 2010;152A (3).
63. Avard D, Silverstein T, Sillon G, Joly Y. Researchers' perceptions of the ethical implications of pharmacogenomics research with children.. *Public Health Genomics*. 2009;12(3):191-201.
64. Gurwitz D, Fortier I, Lunshof JE, Knoppers BM. Research ethics.Children and population biobanks. *Science*. 2009 Aug 14;325(5942):818-9.
65. Hens K, Nys H, Cassiman JJ, Dierickx K. The return of individual research findings in paediatric genetic research. *J Med Ethics*. 2011 Mar;37(3):179-83.

66. Davidson AJ, O'Brien M. Ethics and medical research in children.. *Paediatr Anaesth*. 2009 Oct;19(10):994-1004.
67. Hens K, Nys H, Cassiman JJ, Dierickx K. Biological sample collections from minors for genetic research: a systematic review of guidelines and position articles. *Eur J Hum Genet*. 2009 Aug;17(8):979-90.
68. Hens, K., E. Levesque, and K. Dierickx. Children and biobanks: a review of the ethical and legal discussion. *Hum Genet*. 2011 Sep;130(3):403-13.
69. Molnar MJ, Bencsik P. Establishing a neurologicalpsychiatric biobank: banking, informatics, ethics. *Cell Immunol*. 2006 Dec;244(2):101-4.
70. Rothstein MA. Expanding the ethical analysis of biobanks. *J Law Med Ethics*. 2005 Spring;33(1):89-101.
71. Chalmers D. Genetic research and biobanks. *Methods Mol Biol*. 2011;675:1-37.
72. Hawkins AK. Biobanks: importance, implications and opportunities for genetic counselors. *J Genet Couns*. 2010 Oct;19(5):423-9.
73. Joly Y, Knoppers BM. Pharmacogenomic data sample collection and storage: ethical issues and policy approaches. *Pharmacogenomics*. 2006 Mar;7(2):219-26.
74. Andrews LB. Harnessing the benefits of biobanks. *J Law Med Ethics*. 2005 Spring;33(1):22-30.
75. Laurie G. Role of the UK Biobank Ethics and Governance Council. *Lancet*. 2009 Nov 14;374(9702):1676.
76. Watson RW, Kay EW, Smith D. Integrating biobanks: addressing the practical and ethical issues to deliver a valuable tool for cancer research. *Nat Rev Cancer*. 2010 Sep;10(9):646-51.
77. Anderlik MR, Rothstein MA. Privacy and confidentiality of genetic information: what rules for the new science? *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2001;2:401-33
78. Deplanque D, Birraux G, Bertoye PH, Postaire E. Collections of human biological samples for scientific purposes. Why do current regulation need to be clarified and how? *Therapie*. 2009 Jul-Aug;64(4):259-67.
79. Charo RA. Body of research--ownership and use of human tissue. *N Engl J Med*. 2006 Oct 12;355(15):1517-9.
80. Engels EM. Biobanks as basis for personalised nutrition? Mapping the ethical issues. *Genes Nutr*. 2007 Oct;2(1):59-62.

81. Simon J, J Robiński, Property, personality rights and data protection with regard to biobanks--a layered system. *J Int Bioethique*. 2009 Sep;20(3):47-56.
82. Capron AM, Mauron A, Elger BS, Boggio A, Ganguli-Mitra A, Biller-Andorno N.. Ethical norms and the international governance of genetic databases and biobanks: findings from an international study. *Kennedy Inst Ethics J*. 2009 Jun;19(2):101-24.
83. O'Brien, S.J., Stewardship of human biospecimens, DNA, genotype, and clinical data in the GWAS era. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2009;10:193-209.
84. Caboux, E., A. Plymoth, P. Hainaut, Common minimum technical standards and protocols for biological resource centres dedicated to cancer research. IARC, 2007.
85. Eder J, Dabringer C, Schicho M, Stark K. Data Management for Federated Biobanks. *Lecture Notes in Computer Science*, 2009. 5690, 2009, 184-195.
86. Vegvari A, Welinder C, Lindberg H, Fehniger TE, Marko-Varga G. Biobank resources for future patient care: developments, principles and concepts. *J Clin Bioinforma*. 2011 Sep 16;1(1):24.
87. Tuck M.K, Chan DW, Chia D, Godwin AK, Grizzle WE, Krueger KE. Standard operating procedures for serum and plasma collection: early detection research network consensus statement standard operating procedure integration working group. *J Proteome Res*. 2009 Jan;8(1):113-7.
88. *NCI Best Practices for Biospecimen Resources*. 2011.
89. WHO, Guidance on regulations for the transport of Infectious substances 2011-2012. 2010.
90. Mitchell BL, Yasui Y, Li CI, Fitzpatrick AL, Lampe PD. Impact of freeze-thaw cycles and storage time on plasma samples used in mass spectrometry based biomarker discovery projects. *Cancer Inf* 2005;1(1):98–104.
91. Rai A.J, Gelfand CA, Haywood BC, Warunek DJ, Yi J, Schuchard MD, HUPO Plasma Proteome Project specimen collection and handling: towards the standardization of parameters for plasma proteome samples. *Proteomics*. 2005 Aug;5(13):3262-77.
92. Grizzle W.E, Semmes OJ, Bigbee W, Zhu L, Malik G, Oelschlager DK, The need for review and understanding of SELDI/MALDI mass spectroscopy data prior to analysis. *Cancer Inform*. 2005;1:86-97.
93. Dorr D, Stracke F, Zimmermann H. Noninvasive Quality Control of Cryopreserved Samples. *Biopreserv Biobank*. 2012 Dec;10(6):529-31.

94. Calleros L, Cortés MA, Luengo A, Mora I, Guijarro B, Martín P, Start-up of a clinical sample processing, storage and management platform: organisation and development of the REDinREN Biobank. *Nefrologia*. 2012;32(1):28-34.
95. Baker M., Biorepositories: Building better biobanks. *Nature*. 2012 Jun 6;486(7401):141-6.
96. Von Versen R, Mönig HJ, Salai M, Bettin D. Quality issues in tissue banking: Quality management systems – A review. *Cell Tissue Bank*. 2000;1(3):181-92.
97. Betsou F, Luzergues A, Carter A, Geart P, Riegman P, Clark B, et al. Towards norms for accreditation of biobanks for human health and medical research: compilation of existing guidelines into an ISO certification/accreditation norm compatible format. *The Quality Assurance Journal* 2008; 11(3–4): 221–294.
98. Vreeburg SA, Kruijtzter BP, van Pelt J, van Dyck R, DeRijk RH, Hoogendijk WJ, et al. Associations between sociodemographic, sampling and health factors and various salivary cortisol indicators in a large sample without psychopathology. *Psychoneuroendocrinology*. 2009 Sep;34(8):1109-20.
99. Righini CA, de Fraipont F, Timsit JF, Faure C, Brambilla E, Reyt E, et al. Tumor-Specific Methylation in Saliva: A Promising Biomarker for Early Detection of Head and Neck Cancer Recurrence. *Clin Cancer Res*. 2007 Feb 15;13(4):1179-85.
100. Walsh NP, Laing SJ, Oliver SJ, Montague JC, Walters R, Bilzon JL. Saliva parameters as potential indices of hydration status during acute dehydration. *Med Sci Sports Exerc*. 2004 Sep;36(9):1535-42.
101. Polimeni A, Tremolati M, Falciola L, Pifferi V, Ierardo G, Farronato G. Salivary glucose concentration and daily variation in the oral fluid of healthy patients. *Annali di Stomatologia*. 2014 Mar 31;5(1):1-6.
102. Aps JK, Martens LC. Review: The physiology of saliva and transfer of drugs into saliva. *Forensic Sci Int*. 2005 Jun 10;150(2-3):119-31.
103. Laine MA. Effect of pregnancy on periodontal and dental health. *Acta Odontol Scand*. 2002 Oct; 60(5):257-64.
104. Meurman JH, Tarkkila L, Tiitinen A. The menopause and oral health. *Maturitas*. 2009 May 20;63(1):56-62.
105. Floriano PN, Christodoulides N, Miller CS, Ebersole JL, Spertus J, Rose BG, et al. Use of salivabased nano-biochip tests for acute myocardial infarction at the point of care: a feasibility study. *Clin Chem*. 2009 Aug;55(8):1530-8.
106. Streckfus C, Bigler L, Dellinger T, Dai X, Kingman A, Thigpen JT. The presence of soluble c-erbB-2 in saliva and serum among women with breast carcinoma: a preliminary study. *Clin Cancer Res*. 2000 Jun;6(6):2363-70.

107. Dijkema T, Terhaard CH, Roesink JM, Raaijmakers CP, van den Keijbus PA, Brand HS, et al. MUC5B levels in submandibular gland saliva of patients treated with radiotherapy for head-and-neck cancer: A pilot study. *Radiat Oncol*. 2012 Jun 15;7:91.
108. Battino M, Ferreiro MS, Gallardo I, Newman HN, Bullon P. The antioxidant capacity of saliva. *J Clin Periodontol*. 2002 Mar;29(3):189-94.
109. Taniguchi M, Iizuka J, Murata Y, Ito Y, Iwamiya M, Mori H, et al., Multimolecular Salivary Mucin Complex Is Altered in Saliva of Cigarette Smokers: Detection of Disulfide Bridges by Raman Spectroscopy. *Biomed Res Int*. 2013;2013:168765.
110. Oberoi SS, Mohanty V, Mahajan A, Oberoi A. Evaluating awareness regarding oral hygiene practices and exploring gender differences among patients attending for oral prophylaxis. *J Indian Soc Periodontol*. 2014 May-Jun; 18(3): 369–374.
111. González Sanz AM, González Nieto BA, González Nieto E. Dental health; the relationship between tooth decay and food consumption. *Nutr Hosp*. 2013 Jul;28 Suppl 4:64-71.
112. Lin SS, Kelsey JL, Use of race and ethnicity in epidemiologic research: concepts, methodological issues, and suggestions for research.. *Epidemiol Rev*. 2000;22(2):187-202.
113. Lee YH, Wong DT. Saliva: An emerging biofluid for early detection of diseases. *Am J Dent*. 2009 August ; 22(4): 241–248.



# *APÊNDICES*



## IX. Apêndices

### Anexo A: Questionário para recolha de saliva

#### Parte I – Caraterização

##### 1 – Género

- Masculino;  
 Feminino.

2- Idade: \_\_\_\_\_Anos

3- Qual o seu grupo sanguíneo? \_\_\_\_\_

4- Qual a sua altura atual? \_\_\_\_\_ Cm.

5- Qual o teu peso atual? \_\_\_\_\_ Kg.

##### 6-Área de residência

- Aldeia  
Vila  
Cidade

##### 7- Estado civil

- Solteiro (a);  
 Casado (a);  
 Junto (a);  
 Divorciado (a);  
 Viúvo(a).

##### 8 – Quais as suas habilitações literárias? (*Mencione a mais elevada.*)

Não sabe ler	<input type="checkbox"/>
1- 4 anos	<input type="checkbox"/>
4 – 6 anos	<input type="checkbox"/>
7 – 9 anos	<input type="checkbox"/>
10 – 12 anos	<input type="checkbox"/>
Bacharelato	<input type="checkbox"/>
Licenciatura	<input type="checkbox"/>
Mestrado	<input type="checkbox"/>
Doutoramento	<input type="checkbox"/>

## Parte II- Caracterização da saúde geral

### 1- Nos últimos 12 meses, foi consultado(a) por um médico?

- Não
- Sim. Se sim, qual (ais) a(s) especialidade(s)? *(Pode assinalar várias opções)*
- Medicina geral e familiar;
- Dermatologia;
- Ortopedia;
- Gastroenterologia;
- Ginecologia;
- Outra. Qual(ais)? \_\_\_\_\_;
- Não sei.

### 2- Fez análises pela última vez em que data:

\_\_\_\_\_

### 3- Foram detetados valores anormais:

- Não;
- Sim.
  - Glicose
  - Creatinina
  - Triglicérideos
  - Colesterol Total
  - Colesterol HDL
  - Acido Úrico
  - Proteínas Totais
  - Potássio
  - Albumina
  - TSH
  - PSA
  - Outro \_\_\_\_\_

### 4- Nos últimos 30 dias tomou algum antibiótico?

- Não
- Sim.
  - Se sim, qual? \_\_\_\_\_  Não sei.

### 5- Nos últimos 30 dias, tomou mais algum medicamento?

- Não
- Sim. Se sim, qual? \_\_\_\_\_  Não sei.

### 6- Está a tomar algum medicamento agora (incluindo anticoncepcionais)?

- Não;
- Sim. Se sim, qual? \_\_\_\_\_  Não sei.

**Se for do sexo masculino passe para a pergunta 9.**

**7- Senhoras, encontra-se grávida?**

- Não;
- Sim.

Quantos meses:\_\_\_\_\_

**8- Encontra-se ou já passou pela fase de menopausa?**

- Sim  
Há quanto tempo?\_\_\_\_\_

- Não  
Há quanto tempo teve a última menstruação?\_\_\_\_\_

**9-Atualmente sofre de alguma doença?**

- Não;
- Sim.

- Problemas cardíacos:
  - Doença das artérias coronárias
  - Ataque cardíaco
  - Angina
  - Aneurisma da aorta
  - Arritmias
  - Doença cardíaca congênita
  - Insuficiência cardíaca
  - Doença cardíaca reumática
  - Outro \_\_\_\_\_

- Diabetes: Tipo 1  Tipo 2

- Doenças de sangue: Quais \_\_\_\_\_

- Sofre de alguma doença infecto-contagiosa: Quais \_\_\_\_\_

- Doenças de fígado: Quais \_\_\_\_\_

- Doenças auto-imunes:
  - Doença de Crohn
  - Doença de Behçet
  - Doença de Graves
  - Síndrome de Sjogren
  - Outra

Qual \_\_\_\_\_

- Problemas de estômago: Quais \_\_\_\_\_

- Problemas renais: Quais \_\_\_\_\_

- Epilepsia:

- Asma:

- Urticária:

- Alergias:

- Sinusite:

- Outras: \_\_\_\_\_

**10- Tem hipertensão?**

- Não;
- Sim.

Quais os valores máximo e mínimo que mediu da última vez?

Min: \_\_\_\_\_ Máx: \_\_\_\_\_ Em: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

**11- È alérgico a algum medicamento ou dispositivo médico:**

- Não
- Sim

Se sim quais: \_\_\_\_\_

**12- Foi submetido a algum tratamento de radioterapia ou quimioterapia?**

- Não
- Sim

Indique qual: \_\_\_\_\_

Há quanto tempo? \_\_\_\_\_

**13- Consome bebidas alcoólicas?**

- Não;
- Sim, ocasionalmente
- Sim, todas as semanas
- Sim, todos os dias

**14-É fumador?**

- Sim
- Não

Se sim que idade tinha quando começou a fumar? \_\_\_\_\_ anos.

Em média, quantos cigarros fuma por dia? \_\_\_\_\_

15 – Se é ex-fumador, há quanto tempo deixou de fumar? \_\_\_\_\_ meses.

**PARTE III- SAÚDE E HIGIENE ORAL**

**1-Como descreve a sua saúde oral?**

- Muito boa;
- Boa;
- Razoável;
- Fraca;
- Muito fraca.

**2 - Habitualmente, quantas vezes por dia faz a sua higiene oral? \_\_\_\_\_ vezes.**

**3 – Se respondeu 0 (zero) vezes, ou seja, não realiza a sua higiene oral indique o motivo:**

- Não sente necessidade;
- Não tem destreza manual;
- Não tem apoio de auxiliares/familiares;
- Não dispõe de recursos mecânicos;
- Outro.

**4 –Se respondeu que realiza a sua higiene oral, normalmente, quem a executa?**

- O próprio;
- As auxiliares;
- Familiares.
- Outro. Quem? \_\_\_\_\_.

**5- De cada vez que faz a sua higiene oral, em média, quanto tempo demora?**

- Menos de 1 minuto;
- 1 minuto;
- 2 minutos;
- 3 ou mais minutos.

**6- Utiliza algum dentífrico para a sua higiene oral?**

- Não
- Sim

**7- Utiliza fio dentário/ escovilhão interdentário?**

- Não
- Sim
- Não sei o que é.

**8-Quando é que escova os dentes (pode assinalar mais do que uma)?**

- Manhã
- Ao fim de almoço
- Ao fim do lanche
- Ao fim de jantar
- Antes de deitar

**9-Como realiza a sua higiene oral?**

- Escovo as gengivas, dentes e língua;
- Escovo os dentes e a língua;
- Escovo os dentes e as gengivas;
- Escovo apenas os dentes.

**10- Alguma vez foi consultado(a) por um médico dentista?**

- Não
- Sim

**11 – Aos últimos 12 meses foi consultado(a) por um médico dentista?**

- Não
- Sim. Se sim, quantas vezes? \_\_\_\_\_.

**12 – Qual o motivo da consulta?**

- Rotina;
- Dor de dentes;
- Cara inchada;
- Tratamento de cáries;
- Outro. Qual? \_\_\_\_\_.

**13- Já teve alguma história de doenças da mucosa oral?**

- Sim
- Não

**13.1- Se “Sim” qual a doença que lhe foi diagnosticada?**

\_\_\_\_\_

**14- Costuma sentir a boca seca?**

- Sim
- Não

**15- Considera a consistência da sua saliva normal?**

- Sim
- Não
- Não sei

**PARTE IV- HÁBITOS ALIMENTARES**

**1-Habitualmente, quais as refeições que faz diariamente? (Pode assinalar várias opções)**

- Pequeno-almoço;
- Meio da manhã;
- Almoço;
- Lanche;
- Jantar;
- Ceia.

**2 – Com que frequência come alimentos fritos?**

- Nunca;
- Raramente;
- Às vezes;
- Quase todos os dias;
- Todos os dias.

**3 – Com que frequência come vegetais?**

- Nunca;
- Raramente;
- Às vezes;
- Quase todos os dias;
- Todos os dias.

**4 – Com que frequência come fruta?**

- Nunca;
- Raramente;
- Às vezes;
- Quase todos os dias;
- Todos os dias.

**5- Costuma comer alimentos açucarados?**

- Não
- Sim

**5.1- Se sim, quantas vezes ao dia?**

- 1 vez/ dia
- 2 vezes/ dia
- 3 vezes ou mais

**6- Quando a que costuma comer alimentos açucarados?**

- Após as refeições
- Entre as refeições
- Antes de ir dormir

**7- Costuma consumir leite?**

- Não;
- Sim.

**7.1- Se sim, com que frequência?**

- Menos de 1 copo/dia;
- 1 a 2 copos/dia;
- 3 ou mais copos/dia.

**8- Que tipos de alimentos compõem a sua dieta normal diária?**

- Carne
- Peixe
- Derivados do leite
- Hidratos de carbono
- Vegetais
- Fruta

**9- Nos últimos 30 dias, consumiu bebidas alcoólicas?**

- Não;
- Sim, ocasionalmente;
- Sim, todas as semanas;
- Sim, todos os dias.

**10- Costuma beber refrigerantes?**

- Não
- Sim.

**10.1- Se respondeu “sim”, com que frequência?**

- Raramente;
- Às vezes;
- Quase todos os dias;
- Todos os dias.

**11- Costuma tomar café?**

- Não;
- Sim. Se sim, habitualmente quantos cafés toma por dia? \_\_\_\_\_ cafés.

**PARTE V- QUALIDADE DE VIDA/EXERCÍO FÍSICO**

**1-Costuma praticar exercício físico?**

- Não;
- Sim

**1.1- Se respondeu “Sim”, com que frequência?**

- 1 a 2 vezes por semana
- 3 a 4 vezes por semana
- Só aos fins de semana
- Todos os dias.

**2. Quantos dias por semana costuma andar pelo menos 10 minutos contínuos, não inclua o andar como forma de transporte para ir ou voltar do trabalho.**

\_\_\_\_\_ dias por **SEMANA**       nenhum

## Anexo B: Questionário para recolha de saliva em Inglês

### Part I –Characterization

#### 1 – Gender

- Male
- Female

2- Age: \_\_\_\_\_ years old

3- What's your blood type? \_\_\_\_\_

4- What's your current height? \_\_\_\_\_ Cm.

5- What's your current weight? \_\_\_\_\_ Kg.

#### 6- Residential area

- Village
- Town
- City

#### 7- Marital status

- Single;
- Married;
- Living together as a couple;
- Divorced;
- Widow(er).

#### 8 – What are your qualifications? (*Mention the highest one.*)

Doesn't know how to read	<input type="checkbox"/>
1- 4 years	<input type="checkbox"/>
4 – 6 years	<input type="checkbox"/>
7 – 9 years	<input type="checkbox"/>
10 – 12 years	<input type="checkbox"/>
Bachelor's degree	<input type="checkbox"/>
College degree	<input type="checkbox"/>
Master's degree	<input type="checkbox"/>
Ph.D.	<input type="checkbox"/>

## Part II - Characterization of the general health

### 1- During the past 12 months, have you been seen by a doctor?

- No
- Yes. **If yes, which was(were) the area(s) of expertise?** *(You can check more than one option.)*
- General medicine and familiar;
- Dermatology;
- Orthopedy;
- Gastroenterology;
- Gynecology;
- Other. Which one(s)? \_\_\_\_\_;
- I don't know.

### 2- When have you last had a blood test? *(date)*

\_\_\_\_\_

### 3- Abnormal results have been detected:

- No;
- Yes.
  - Glucose
  - Creatinin
  - Neutral fat
  - Global cholesterol
  - Cholesterol HDL
  - Uric acid
  - Global proteins
  - Potassium
  - Albumin
  - TSH
  - PSA
  - Other \_\_\_\_\_

### 4- During the past 30 days, have you taken any antibiotic?

- No
- Yes.
  - If yes, which one? \_\_\_\_\_  I don't know.

### 5- During the past 30 days, have you taken any medication?

- No
- Yes. **If yes, which one?** \_\_\_\_\_  I don't know.

### 6- Are you taking any medication now (including birth control)?

- No;
- Yes. **If yes, which one?** \_\_\_\_\_  I don't know.

**If you are a male subject, jump to question 9.**

**7- Are you pregnant?**

- No;
- Yes.

For how long? \_\_\_\_\_ (*in months*)

**8- Are you going or have you been through menopause?**

- Yes

For how long? \_\_\_\_\_

- No

How long ago was your last period? \_\_\_\_\_

**9- Do you currently suffer from any kind of disease?**

- No;
- Yes.

Heart problems:

- Coronary arteries disease
- Heart attack
- Angina
- Aneurism of the aorta
- Arrythmias
- Congenital heart disease
- Heart failure
- Rheumatic cardiac disease
- Other \_\_\_\_\_

Diabetes: Type 1  Type 2

Blood diseases: Which one(s) \_\_\_\_\_

Do you suffer from any contagious disease? Which one(s) \_\_\_\_\_

Liver diseases: Which one(s) \_\_\_\_\_

Self-immune diseases:

- Crohn disease
- Behçet disease
- Graves disease
- Sjogren syndrom
- Other

Which one \_\_\_\_\_

Stomach problems: Which one(s) \_\_\_\_\_

Kidney problems: Which one(s) \_\_\_\_\_

Epilepsy:

Asthma:

Nettle rash (hives):

Allergies:

Sinusitis:

Other: \_\_\_\_\_

**10- Do you suffer from hypertension?**

- No;
- Yes.

Which are the maximum and minimum values the last time you've measured?

Min: \_\_\_\_\_ Max: \_\_\_\_\_ On: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

**11- Are you allergic to any medicine or to any medical device:**

- No
- Yes

If yes, to which one(s): \_\_\_\_\_

**12- Have you been subject to some type of radio or chemotherapy treatment?**

- No
- Yes

Mention which one(s): \_\_\_\_\_

How long ago? \_\_\_\_\_

**13- Do you drink alcohol?**

- No;
- Yes, occasionally
- Yes, every week
- Yes, everyday

**14- Are you a smoker?**

- Yes
- No

If yes, how old were you when you started smoking? \_\_\_\_\_ years old

In average, how many cigarettes do you smoke a day? \_\_\_\_\_.

**15 – If you are a ex-smoker, how long ago did you quit smoking? \_\_\_\_\_ months.**

**PART III – ORAL HEALTH AND HYGIENE**

**1 – How would you describe your oral health?**

- Very good;
- Good;
- Average;
- Poor;
- Very poor.

**2 – How many times a day do you usually do your oral hygiene? \_\_\_\_\_ times.**

**3 – If you've answered 0 (zero) times, which means you don't do your oral hygiene, identify the reason for it:**

- You don't feel the need to do it;
- You don't have the manual agility;
- You don't have caretakers'/relatives' support;
- You don't have the mechanical resources;
- Other.

**4 – If you've answered that you do your oral hygiene, who is it that usually does it?**

- Yourself;
- The caretakers;
- Relatives.
- Other. Who? \_\_\_\_\_.

**5- Each time you usually do your oral hygiene, how long does it take you, in average?**

- Less than 1 minute;
- 1 minute;
- 2 minutes;
- 3 or more minutes.

**6- Do you use any toothpaste during your oral hygiene?**

- No
- Yes

**7- Do you use dental floss/interdental sponge?**

- No
- Yes
- I don't know what that is.

**8- When do you brush your teeth? (You can check more than one option.)**

- In the morning
- After lunch
- After having a snack
- After dinner
- Before going to bed

**9- How do you do your oral hygiene?**

- I brush my gums, teeth and tongue;
- I brush my teeth and tongue;
- I brush my teeth and gums;
- I brush just my teeth.

**10- Have you ever been seen by a dentist?**

- No
- Yes

**11 – Have you been seen by a dentist during the past 12 months?**

- No
- Yes. If yes, how many times? \_\_\_\_\_ times.

**12 – What was the reason for the dentist’s appointment?**

- Routine;
- Toothache;
- Swollen face;
- Cavities treatment;
- Other. Which one(s)? \_\_\_\_\_.

**13- Have you had any history of oral soft tissue disease?**

- Yes
- No

**13.1- If yes, what was the diagnosed disease?**

\_\_\_\_\_

**14- Do you usually feel your mouth dry?**

- Yes
- No

**15- Do you consider the consistency of your saliva as normal?**

- Yes
- No
- I don’t know

**PART IV – EATING HABITS**

**1- Which are the meals you usually have everyday? (You can check several options.)**

- Breakfast;
- A snack during the morning;
- Lunch;
- Afternoon snack;
- Dinner;
- Supper.

**2 – How often do you eat fried food?**

- Never;
- Rarely;
- Sometimes;
- Almost everyday;
- Everyday.

**3 – How often do you eat vegetables?**

- Never;
- Rarely;
- Sometimes;
- Almost everyday;
- Everyday.

**4 – How often do you eat fruit?**

- Never;
- Rarely;
- Sometimes;
- Almost everyday;
- Everyday.

**5- Do you usually eat sweetened food?**

- No
- Yes

**5.1- If yes, how many times a day?**

- Once a day
- Twice a day
- 3 times or more

**6- When do you usually eat sweetened food?**

- After meals
- Between meals
- Before going to sleep

**7- Do you usually drink milk?**

- No;
- Yes.

**7.1- If yes, how often?**

- Less than one glass a day;
- 1 to 2 glasses a day;
- 3 or more glasses a day.

**8- What kind of food is included in your daily diet?**

- Meat
- Fish
- Milk and dairy products
- Carbohydrates
- Vegetables
- Fruit

**9- During the past 30 days, have you drank any alcohol?**

- No;
- Yes, occasionally;
- Yes, every week;
- Yes, everyday.

**10- Do you usually drink soft drinks?**

- No
- Yes.

**10.1- If you've answered yes, how often?**

- Rarely;
- Sometimes;
- Almost everyday;
- Everyday.

**11- Do you usually drink coffee?**

- No;
- Yes. If yes, how many cups of coffee do you usually have a day? \_\_\_\_\_ cups.

**PART V- LIFE QUALITY/PHYSICAL EXERCISE**

**1- Do you usually do physical exercise?**

- No;
- Yes

**1.1- If you've answered yes, how often?**

- Once or twice a week
- 3 or 4 times a week
- Only at the weekend
- Everyday

**2. How many days a week do you usually walk at least 10 consecutive minutes, not including walking as a means of transport to go or come back from work.**

\_\_\_\_\_ days a WEEK  None

## **Anexo C: Modelo informativo para o dador de amostras biológicas**

### **Informação ao dador de amostras biológicas**

#### **Título do projeto de investigação**

#### **Objetivo da recolha**

A criação de um banco de amostras de saliva permitirá o desenvolvimento de ferramentas de diagnóstico e de investigação em múltiplas áreas da medicina. Porém, este objetivo só será cumprido com a colaboração dos doentes e dos indivíduos saudáveis, através da doação de amostras biológicas (saliva) que será guardada e preservada em condições apropriadas de forma a ser utilizada para futuros estudos. Uma das vantagens que obtemos através de um biobanco é o acompanhamento dos participantes quer através dos seus registos médicos como das suas amostras doadas.

Sabe-se há muitos anos que o risco de desenvolver diferentes doenças é devido a uma complexa combinação de diferentes fatores: o nosso estilo de vida, determinantes ambientais, suscetibilidade pessoal e a predisposição genética. O envolvimento de milhares de pessoas num biobanco que desenvolveram uma doença em particular, deve ser capaz de mostrar de uma forma mais confiável porque algumas pessoas desenvolvem a doença e outras não. Ajudando a encontrar deste modo novos métodos de tratamento. A saliva apresenta diversas potencialidades em termos dos seus elementos básicos constituintes e da sua contribuição para o conhecimento da biologia oral e diagnóstico da patologia oral. A recolha da saliva é realizada de forma não invasiva, podendo ser efetuadas várias recolhas sem causar desconforto no dador.

#### **Procedimentos**

No caso de concordar em participar neste projeto, ser-lhe-á colhida uma amostra biológica de saliva. Esta amostra será preservada em condições apropriadas e as informações clínicas com ela relacionada serão introduzidas numa base de dados, passando a sua identificação pessoal a estar codificada e não acessível aos utilizadores das amostras, a gestão da chave de correspondência dos códigos é da responsabilidade do diretor do biobanco.

A doação da amostra é voluntária e revogável, sendo que o dador, ou o seu representante legal, tem o direito de retirar a amostra e/ou interromper a colaboração assim que achar conveniente, sem necessidade de justificação. O dador ou o seu

representante legal deverá manifestar por escrito a sua vontade em retirar a amostra ou interromper a colaboração e nestas situações a amostra será imediatamente destruída.

O dador poderá escolher se quer ser informado dos resultados com potencial relevância para a sua saúde. O pedido de resultados deverá ser feito por escrito para o biobanco e deve ser expresso no consentimento informado.

Serão cumpridas todas as normas éticas aceites internacionalmente para o uso de matérias biológicas para fins de investigação.

A participação neste projeto envolve:

- O Preenchimento de um questionário simples.

- Uma declaração de consentimento informado, esta consiste num consentimento amplo, que permite o uso das amostras biológicas e dos dados relacionados em investigações imediatas e em futuras investigações de qualquer tipo, a qualquer momento. A investigação deve ser de grande importância, garantindo a máxima privacidade aos participantes, sendo que em qualquer momento podem retirar o seu consentimento. Todas as investigações têm de ser aprovadas por um comité de ética.

- Ser re-contactado pelo biobanco no futuro para responder a mais perguntas e / ou participar numa nova avaliação (incluindo novas amostras ou questões), sendo esta ajuda totalmente opcional.

- Concordar que as suas amostras e as suas informações de saúde sejam armazenadas e utilizadas por investigadores aprovados ao longo de vários anos.

- Uma vasta gama de testes serão feitos nas amostras de saliva sendo impossível prever todos os usos a que as amostras podem ser colocadas durante as próximas décadas.

### **Identificação das amostras e Confidencialidade**

A confidencialidade dos dados dos participantes é uma prioridade para Biobanco.

Um biobanco é composto por uma base de dados que contem informação clínica referente ao doente ou ao indivíduo saudável. Após a colheita, as amostras serão identificadas por um código de forma a preservar a privacidade.

A equipa de investigação poderá necessitar de recolher informação do processo clínico para a execução do estudo durante o desenvolvimento de um projeto de investigação. Estando o anonimato sempre garantido, os dados do processo clínico serão fornecidos ao investigadores, mas sem qualquer identificação não permitindo saber a quem pertencem.

Só poderá ser feita a ligação da amostra ao dador em caso de absoluta necessidade, por motivos de saúde do dador e a pedido deste, e sempre de acordo com as disposições legais em vigor. São tomadas rigorosas medidas de segurança para impedir o uso não autorizado tais como: controle de acesso, segurança nos computadores, acordos de confidencialidade e treino da equipa.

### **Comunicação e divulgação de dados**

As amostras biológicas colhidas para fins de investigação científica podem ser transferidas para outros centros de investigação, para fins de investigação, mediante consentimento do participante na declaração de consentimento informado.

### **Possíveis benefícios para os participantes**

Participação no biobanco é inteiramente voluntária sendo uma doação altruísta. Não se garante que este estudo envolva benefícios diretos para o participante. Caso algum estudo seja relevante para a saúde do dador, este será informado, caso esteja expresso na declaração de consentimento informado.

### **Riscos físicos previsíveis**

Os riscos e o desconforto associados serão mínimos ou inexistentes. A colheita de amostras de saliva é um método simples e rápido é realizado de forma não invasiva sendo de fácil obtenção. De qualquer modo, o dador será sempre antecipadamente informado dos riscos e do grau de desconforto associados aos procedimentos.

### **Participação Voluntária e Direitos de Abandono**

A qualquer momento o dador pode retirar o seu consentimento, suspendendo a sua participação, sendo as amostras em seguida destruídas. A participação é voluntária sendo que a recusa em não participar não envolve qualquer penalização ou perda de benefícios.

## **Anexo D: Modelo de declaração de consentimento informado**

### **Declaração de consentimento informado**

Investigador: \_\_\_\_\_

Nome do doente: \_\_\_\_\_

Número de estudo do doente: \_\_\_\_\_

Eu, \_\_\_\_\_, portador do bilhete de identidade/cartão do cidadão n.º [ \_\_\_\_\_ ], declaro ter tomado conhecimento e aceitar participar neste projeto, de forma a contribuir para a criação de um banco de amostras biológicas com informação clínica associada, para fins de investigação biomédica.

Aceito que a minha amostra biológica seja utilizada em projetos de investigação. A qualquer momento posso retirar a minha autorização para a utilização da minha amostra biológica e informação clínica. Tomei conhecimento do propósito do biobanco e tive oportunidade de esclarecer qualquer dúvida.

Assim como me foram esclarecidos os procedimentos relativos à colheita e utilização da minha amostra biológica e dados a ela associados.

Declaro que aceito participar, voluntariamente, neste estudo.

#### **Especificamente concordo com os seguintes pontos:**

- Consinto a colheita de saliva e autorizo a conservação da amostra no biobanco, podendo ser usada para investigações futuras.

Sim  Não

- **Se já cedeu amostras biológicas de saliva noutros projetos responda a esta pergunta, caso contrário passe para a próxima pergunta.** Nestas circunstâncias, autorizo a transferência das minhas amostras biológicas previamente colhidas no âmbito de outros projetos, para o biobanco de modo que elas possam ser utilizadas em futuras investigações.

Sim  Não

- Estou consciente de que minha participação é voluntária e que a qualquer momento posso retirar o meu consentimento, suspendendo a minha participação, sendo as minhas amostras biológicas destruídas em seguida. A recusa em não participar não envolve qualquer penalização ou perda de benefício.

Sim  Não

- Quero conhecer os resultados que possam ser relevantes para a minha saúde.

Sim  Não

- Autorizo ser contactado pelo biobanco para atualização da minha situação clínica;

Sim  Não

---

Data

---

Assinatura do Doente/Representante Legal

Em caso de representante legal, qual o poder que exerce:

- Titular do poder paternal, quando o dador é menor
- Tutor, quando o dador foi declarado interdito
- Herdeiro, quando o dador faleceu

Foi explicado ao dador este estudo de investigação informando-o dos seus possíveis benefícios e riscos, considerando que o participante compreendeu a minha explicação.

---

Data

---

Nome do Médico

---

Assinatura do Médico

## **Anexo E: Questionário para os investigadores**

**1- Considera a informação presente no questionário suficiente para a realização de um estudo em que pretende analisar amostras salivares?**

Sim       Não

1.1-Se respondeu não, que informação acrescentaria no questionário?

---

---

---

**2- Considera que seria capaz de analisar e associar amostras salivares com as variáveis introduzidas no questionário?**

Sim       Não

**3-Em estudos futuros acha a informação recolhida importante?**

Sim       Não

3.1-Se respondeu não, qual a justificação que sugere?

---

---

---

**4- Compraria amostras salivares conservadas a -80°C cuja informação associada fosse a constante no questionário apresentado?**

Sim       Não

Se respondeu não indique porquê?

---

---

---

**Anexo F: Questionário para os investigadores em inglês**

**1- Do you consider the information in the questionnaire enough for a research in which you wish to analyze saliva samples?**

Yes       No

1.1- If you've answered no, what information would you add to the questionnaire?

---

---

---

**2-Do you consider that you would be able to analyze and associate saliva samples with the variables included in the questionnaire?**

Yes       No

**3-Do you find the gathered information important in future studies?**

Yes       No

3.1-If you've answered no, what is the justification you suggest?

---

---

---

**4-Would you buy saliva samples kept at -80°C associated to the information collected from the present questionnaire?**

Yes       No

4.1-If you've answered no, specify the reason why.

---

---

---

## **Anexo G: E-mail para os investigadores em português**

Eu, Graciela Sofia Carvalho Santos, aluna do 5ºano do Mestrado Integrado em Medicina Dentária da Universidade Católica Portuguesa, sob coordenação da Professora Doutora Maria José Correia e do Mestre Nélio Veiga, encontro-me a desenvolver um trabalho de investigação intitulado “ *Saliva: identificação de variáveis fundamentais para a recolha de amostras de um biobanco*”.

O objetivo deste trabalho consiste em desenhar um questionário a aplicar aos dadores de saliva que venham a contribuir para um biobanco para o estudo deste fluido.

Venho, deste modo, pedir a sua colaboração neste trabalho de investigação através da resposta às seguintes questões sobre a aplicabilidade do questionário que está a ser desenhado.

Enviamos em anexo o questionário para observação e apreciação, permitindo depois responder às questões colocadas no final deste *e-mail*.

Muito obrigado pela sua colaboração.

Com os melhores cumprimentos,

Graciela Santos

**Anexo H: E-mail para os investigadores em inglês**

I, Graciela Sofia Carvalho Santos, student in the 5th year of the Master's degree in Dental Medicine at the Portuguese Catholic University in Viseu, Portugal, under the coordination of Professor Maria José Correia and Dr. Nélio Veiga, am currently developing a research study entitled "***Saliva: identification of fundamental variables for the gathering of samples of a biobank***". The main goal of this research is to design a questionnaire to apply to the donors of saliva who may contribute to a biobank of this fluid.

Thus, I would like to kindly ask for your collaboration in this research by answering the following questions about the applicability of the questionnaire which is being designed.

We have attached the questionnaire to apply to the donors of saliva for your appreciation and ask you to kindly answer, the questions at the end of this email about the pertinence and usefulness of the questionnaire.

Thank you very much for your collaboration.

Best regards,

Santos, Graciela

**Anexo I: Lista de investigadores contactados**

Artigo	Autor	E-mail
Effect of infancy-onset dietary intervention on salivary cholesterol of children: a randomized controlled trial.	Sara.karjalainen. utu.fi	sara.karjalainen@utu.fi
Stability of salivary steroids: the influences of storage, food and dental care	Michael Großschl	michael.groeschl@kinder.imed.uni-erlangen.de
Evaluation of saliva as a source of human DNA for population and association studies	Dominique Quinque	nasidze@eva.mpg.de
Biochemical analysis of saliva and taste acuity evaluation in patients with burning mouth syndrome, xerostomia and/or gustatory disturbances	Oded Hershkovich	nagler@tx.technion.ac.il
Comparative proteomic analysis of human whole Saliva	Chun-Ming Huang	chunming@uab.edu
Fatty acid profile of human saliva: a possible indicator of dietary fat intake	Adriana B. Actis	adractis@odo.unc.edu.ar
Saliva as research material: Biochemical, physicochemical and practical aspects	Raymond G. Schipper	Raymond.Schipper@wur.nl
Saliva as a viable	Daniel P.K. Ng	cofnpkd@nus.edu.sg

alternative source of human genomic DNA in genetic epidemiology		
Saliva collection method affects predictability of serum cortisol	Eva-Maria Poll	epoll@ukaachen.de
Saliva specimen: A new laboratory tool for diagnostic and basic investigation	Silvia Chiappin	eliof.depalo@unipd.it
Impact of saliva collection methods on sIgA and cortisol assays and acceptability to participants	Lyndall Strazdins	Lyndall.Strazdins@anu.edu.au
Saliva collection methods for DNA biomarker analysis in oral cancer patients	April M. Matthews	j.m.risk@liverpool.ac.uk j.m.risk@liv.ac.uk
Assessing salivary cortisol in large-scale, epidemiological research	Emma K. Adam	M.Kumari@ucl.ac.uk
Exploring the concurrent presence of hepatitis A virus genome in serum, stool, saliva, and urine samples of hepatitis A patients	Madhuri S. Joshi	drshobha.niv@gmail.com
Saliva as a tool for oral cancer diagnosis and prognosis	Rafael M. Nagler	nagler@tx.technion.ac.il
Progression of salivary gland dysfunction in	J Pijpe	a.vissink@kchir.umcg.nl

patients with Sjögren's syndrome		
The use of salivary biomarkers in occupational and environmental medicine	David Soo-Quee Koh	cofko@d@nus.edu.sg
Effect of saliva processing on bacterial DNA Extraction	Kamila Polgárová	kamila.polgarova@gmail.com
Proteomics Analysis of Cells in Whole Saliva from Oral Cancer Patients via Value-added Three-dimensional Peptide Fractionation and Tandem Mass Spectrometry	Hongwei Xie	tgriffin@umn.edu
Saliva-Derived DNA Performs Well in Large-Scale, High-Density Single-Nucleotide Polymorphism Microarray Studies	Melanie Bahlo	bahlo@wehi.edu.au
Promoter Hypermethylation Patterns of p16, O6-Methylguanine-DNA methyltransferase, and Death-associated Protein Kinase in Tumors and Saliva of Head and Neck Cancer Patients	Siane Lopes Bittencourt Rosas	dsidrans@jhmi.edu
Tumor-	Christian Adrien	MCFavrot@chu-grenoble.fr

SpecificMethylation in Saliva: A Promising Biomarker for Early Detection of Head and Neck Cancer Recurrence	Righini	
Clinical trial participant characteristics and saliva and DNA metrics	Denise M Nishita	denise.nishita@sri.com lisa.jack@sri.com andrew.bergen@sri.com mcclure.j@ghc.org richards.je@ghc.org gary.swan@sri.com andrew.bergen@sri.com
Use of Saliva-Based Nano-Biochip Tests for Acute Myocardial Infarction at the Point of Care: A Feasibility Study	Pierre N. Floriano	mcdevitt@rice.edu
Saliva samples are a viable alternative to blood samples as a source of DNA for high throughput genotyping	Jean E Abraham	ja344@medschl.cam.ac.uk
Saliva sampling in global clinical studies: the impact of low sampling volume on performance of DNA in downstream genotyping experiments	David J Pulford	david.x.pulford@gsk.com
Current Status of Salivary Hormone Analysis	Michael Groeschl	michael.groeschl@uk-erlangen.de
Effects of the UK Biobank collection protocol on	Rashida Pramanik,	gordon.proctor@kcl.ac.uk

potential biomarkers in saliva		
Collection of Blood, Saliva, and Buccal Cell Samples in a Pilot Study on the Danish Nurse Cohort: Comparison of the Response Rate and Quality of Genomic DNA	Thomas v. O. Hansen	tvoh@rh.dk
Tumor SpecificMethylation in Saliva: A Promising Biomarker for Early Detection of Head and Neck Cancer Recurrence	Christian Adrien Righini,	MCFavrot@chu-grenoble.fr
Salivary Analysis of Drugs—Potential and Difficulties	S. Townsend	Richardokennedy@gmail.com
Banking of Biological Fluids for Studies of Disease-associated Protein Biomarkers	Anne-Sofie Schrohl	nbr@life.ku.dk
Electronic health records for biological sample collection: feasibility study of statin-induced myopathy using the clinical practice research datalink	Helen O’Meara	munirp@liv.ac.uk
Quality and Quantity of Saliva DNA Obtained from the Self-administrated Oragene	Tove Rylander-Rudqvist,	tove.rylander-rudqvist@ki.se

Method—A Pilot Study on the Cohort of Swedish Men		
Saliva and Dental Caries	M. Lenander-Lumikari	marlen@utu.fi
Quantitative Proteomics Reveals Myosin and Actin as Promising Saliva Biomarkers for Distinguishing Pre-Malignant and Malignant Oral Lesions	Ebbing P. de Jong	tgriffin@umn.edu
Pro-inflammatory cytokines in saliva of adolescents with dental caries disease	Agnieszka Gornowicz	aniabiel@umb.edu.pl
Salivary glands and saliva	AV Nieuw Amerongen	a.van_nieuw_amerongen.obc.acta@med.vu.nl
Collecting Saliva and Measuring Salivary Cortisol and Alpha-amylase in Frail Community Residing Older Adults via Family Caregivers	Nancy A. Hodgson	nhodgs01@jhu.edu
Mucin levels in saliva of adolescents with dental caries	Halina Gabryel-Porowska	agnieszka.gornowicz@umb.edu.pl
Human Saliva Proteome and Transcriptome	S. Hu	dtww@ucla.edu
A Comparison of the	Robert A.	robert-philibert@uiowa.edu

Genotyping Results Using DNA Obtained from Blood and Saliva	Philibert, M.D.	
Salivary Proteomics for Oral Cancer Biomarker Discovery	Shen Hu	dwong@dentistry.ucla.edu
The Proteomes of Human Parotid and Submandibular/Sublingual Gland Salivas Collected as the Ductal Secretions	Paul Denny	sfisher@cgl.ucsf.edu
Systematic comparison of the human saliva and plasma Proteomes	Weihong Yan	dtww@ucla.edu
Effect of HIV-1 infection on human DNA yield from saliva	Rebecca J. Basham, B.S	david.w.haas@vanderbilt.edu
New Saliva DNA Collection Method Compared to Buccal Cell Collection Techniques for Epidemiological Studies	Nikki L. Rogers	nikki.rogers@wright.edu
Salivary Proteomic and Genomic Biomarkers for Primary Sjögren's Syndrome	Shen Hu, PhD	dtww@ucla.edu
Sample collection and handling considerations for peptidomics studies in whole saliva; implications for biomarker discovery	Ebbing P. de Jong	tgriffin@umn.edu
Patients' Willingness to	Christoph I.	LBassett@mednet.ucla.edu

Participate in a Breast Cancer Biobank at Screening Mammogram	Lee, MD, MSHS	MLeng@mednet.ucla.edu smaliski@sonnet.ucla.edu bryanpez@gmail.com ColinWells@mednet.ucla.edu cmangione@mednet.ucla.edu ANaeim@mednet.ucla.edu
Implementing Self-collection of Biological Specimens With a Diverse Sample	April Fernandes	skinm@u.washington.edu
Genotyping Performance between Saliva and Blood-Derived Genomic DNAs on the DMET Array: A Comparison	Yueshan Hu	gareth.davies@avera.org
Identification of N-Linked Glycoproteins in Human Saliva by Glycoprotein Capture and Mass Spectrometry	Prasanna Ramachandran	JLoo@chem.ucla.edu
Brief Report: A Comparison of Saliva Collection Methods With Preschool Children: The Perspectives of Children, Parents, and Childcare Practitioners	Christine O'Farrelly BA	christineof@gmail.com
Saliva: A potential media for disease diagnostics and monitoring	Jingyi Liu	yduan@scu.edu.cn
Relationship of stimulated whole saliva cortisol level with the severity of a	Farzaneh Agha- Hosseini	aghahose@sina.tums.ac.ir

feeling of dry mouth in menopausal women		
The impact of saliva collection and processing methods on CRP, IgE, and Myoglobin immunoassays	Roslinda Mohamed	c.punyadeera@uq.edu.au
Collecting saliva by mail for genetic and cotinine analyses in participants recruited through the internet	Jean-François Etter	jean-francois.etter@imsp.unige.ch
Salivary Markers of Systemic Disease: Noninvasive Diagnosis of Disease and Monitoring of General Health	Herenia P. Lawrence	herenia.lawrence@utoronto.ca
Human saliva as a tool to investigate intimate partner violence	Chamindie Punyadeera	c.punyadeera@uq.edu.au
Detection of Plasmodium vivax and Plasmodium falciparum DNA in human saliva and urine: Loop-mediated isothermal amplification for malaria diagnosis.	Najafabadi ZG	razmjou.e@iums.ac.ir
Influence of Antiretroviral Therapy and Periodontal Disease on Human Salivary Beta-Defensin 2 in Patients Infected with HIV.	Lourenço AG	mckomesu@usp.br
Early Stage	Don-Felix	gpsychogios@gmail.com

Oropharyngeal Carcinomas: Comparing Quality of Life for Different Treatment Modalities	Ryzek	
Monitoring Caries Risks before the Window of Infection and Later Caries Increment: A Caries Prediction Study on Rapid Detection of Streptococcus mutans Using Monoclonal Antibodies.	Maki Y.	maki@tdc.ac.jg
Proteomic Analysis of Saliva in HIV-Positive Heroin Addicts Reveals Proteins Correlated with Cognition	Stephen S. Dominy	stephen.dominy@ucsf.edu
Mineral licks: motivational factors for visitation and accompanying disease risk at communal use sites of elk and deer.	Lavelle MJ	michael.j.lavelle@aphis.usda.gov
Exome capture from saliva produces high quality genomic and metagenomic data	Jeffrey M Kidd	brenna.henn@stonybrook.edu
The effect of saliva substitutes on enamel erosion in vitro.	Aykut-Yetkiner A	a_aykut@hotmail.com
Bacterial interactions with	Krajewski S	

proteins and cells relevant to the development of life-threatening endocarditis studied by use of a quartz-crystal microbalance		frank.rupp@med.uni-tuebingen.de
Proteomic Analysis of Saliva from Patients with Oral Chronic Graft-Versus-Host Disease	Ivana Devic	rp@uw.edu
DHEA, Physical Exercise And Doping.	Collomp K	katia.collomp@univ-orleans.fr
In-vivo force decay of nickel-titanium closed-coil springs.	Cox C	Chang_Ko@unc.edu
CRHR1 genotype and history of maltreatment predict cortisol reactivity to stress in adolescents	Sumner JA	js4456@columbia.edu
Evaluation of Salivary Flow Rate, pH and Buffer in Pre, Post & Post Menopausal Women on HRT	Mahesh D.R.	maheshsvdc@rediffmail.com
HIV-1 RNA Levels and Antiretroviral Drug Resistance in Blood and Non-Blood Compartments from HIV-1-Infected Men and Women enrolled in AIDS Clinical Trials Group Study A5077.	Kantor R	rkantor@brown.edu
Evaluation of radioprotective effect of	Pimentel MJ	marcelejardim@gmail.com linoj@uol.com.br

pilocarpine ingestion on salivary glands.		
Understanding Aroma Release from Model Cheeses by a Statistical Multiblock Approach on Oral Processing	Gilles Feron	elisabeth.guichard@dijon.inra.fr
Characterization of salivary proteins of schizophrenic and bipolar disorder patients by top-down proteomics	Iavarone F	massimo.castagnola@icrm.cnr.it
Enteral nutrition feeding alters antioxidant activity in unstimulated whole saliva composition of patients with neurological disorders	Cunha-Correia AS	saguiar@foa.unesp.br
Cytokines and chemokines are differentially expressed in patients with periodontitis: Possible role for TGF- $\beta$ 1 as a marker for disease progression	Khalaf H	hazem.khalaf@oru.se
Dental caries, cariogenic microorganisms and salivary properties of allergic rhinitis children.	Wongkamhaeng K	koontongkaew@yahoo.com
Effect of moisture, saliva, and blood contamination on the shear bond strength of brackets bonded with a conventional bonding	Prasad M	mandavabruno9@hotmail.co.in

system and self-etched bonding system		
Estimation of serum and salivary immunoglobulin G and immunoglobulin A in oral pre-cancer: A study in oral submucous fibrosis and oral lichen planus	Divya VC	drdivyavc@gmail.com
Effect of induction chemotherapy on swallow physiology and saliva production in patients with head and neck cancer: A pilot study.	Mittal BB	j-logemann@northwestern.edu
Salivary DNA and markers of oxidative stress in patients with chronic periodontitis.	Bañasová L	petercelec@gmail.com
Salivary and serum cortisol levels, salivary alpha-amylase and unstimulated whole saliva flow rate in pregnant and non-pregnant.	Abrao AL	rbgo@fmrp.usp.br
The Effect of Acute Exercise and Psychosocial Stress on Fine Motor Skills and Testosterone Concentration in the Saliva of High School Students	Mirko Wegner	mirko.wegner@ispw.unibe.ch  henning.budde@medicalschoo- hamburg.de
Herpes simplex virus reactivation as a trigger of	Kurata M	ymizu@ks.kyorin-u.ac.jp

mucous lesions in pemphigus vulgaris		
Child abuse, depression, and methylation in genes involved with stress, neural plasticity, and brain circuitry	Weder N	06520.joan.kaufman@yale.edu
CYP19A1 promoter methylation in saliva associated with milestones of pubertal timing in urban girls.	Stueve TR	jia.chen@mssm.edu
Arthropod Saliva: the Missing Piece of the Hygiene/Health/Disease Puzzle	John Santiago Mejia	smejia@boulderdiagnostics.com
Altered Bacterial Profiles in Saliva from Adults with Caries Lesions: A Case-Cohort Study	Daniel Belstrøm	dbel@sund.ku.dk
Testosterone, cortisol, and psychopathic traits in men and women	Welker KM	welkerk@wayne.edu
Characteristics of Men and Premenopausal Women With Burning Mouth Symptoms: A Case-Control Study	Kim Y	hkho@snu.ac.kr
Nicotine patches in pregnant smokers: randomised, placebo controlled, multicentre trial of efficacy.	Berlin I	ivan.berlin@psl.aphp.fr

High correlation between salivary cortisol awakening response and the psychometric profiles of healthy children.	Shibuya I	kaoru@med.kurume-u.ac.jp
Effects of Hatha Yoga on Blood Pressure, Salivary $\alpha$ -Amylase, and Cortisol Function Among Normotensive and Prehypertensive Youth	Sieverdes JC	sieverde@musc.edu
Early collection of saliva specimens from Bell's palsy patients: Quantitative analysis of HHV-6, HSV-1, and VZV.	Turriziani O	ombretta.turriziani@uniroma1.it
Saliva as a matrix for human biomonitoring in occupational and environmental medicine	Michalke B	Thomas.Goen@ipasum.med.uni-erlangen.de
Prostate Cancer Detection Using a Noninvasive Method for Quantifying miRNAs.	Rodríguez-Dorantes M	mrodriguez@inmegen.gob.mx
Salivary lactoferrin in HIV-infected children: Correlation with Candida albicans carriage, oral manifestations, HIV infection and its antifungal activity.	Alves TP	mbportela@hotmail.com

RNA interference inhibits herpes simplex virus type 1 isolated from saliva samples and mucocutaneous lesions.	da Silva AP	vdepaula@fiocruz.br
The influence of sex hormones on anterior cruciate ligament rupture: female study	Stijak L	lazar.stijak@gmail.com
Human biomonitoring of emerging pollutants through non-invasive matrices: state of the art and future potential.	Alves A	andrea.alves@vito.be
Molecular analysis of oral bacteria in dental biofilm and atherosclerotic plaques of patients with vascular disease.	Fernandes CP	clarissa_pf@hotmail.com
Salivary creatinine estimation as an alternative to serum creatinine in chronic kidney disease patients.	Venkatapathy R	mgpgiopath@gmail.com
Quantitative detection of epidermal growth factor and interleukin-8 in whole saliva of healthy individuals	Dafar A	hulya.cevik@odontologi.gu.se
In pre-school children, sleep objectively assessed via actigraphy remains stable over 12 months and	Hatzinger M	serge.brand@upkbs.ch

is related to psychological functioning, but not to cortisol secretion.		
Effect of repeated administration of lipopolysaccharide on inflammatory and stress markers in saliva of growing pigs	Escribano D	Elodie.Merlot@rennes.inra.fr
The effects of SES on infant and maternal diurnal salivary cortisol output.	Clearfield MW	clearfmw@whitman.edu
Acute one-cigarette smoking decreases ghrelin hormone in saliva: a pilot study.	Yahia A. Kaabi	yahya 179@hotmail.com
Prevalence of CMV infection among sexually active adolescents: a matched case-control study	Foxworth MK	sadler@vcu.edu
A critical evaluation of salivary testosterone as a method for the assessment of serum testosterone.	Fiers T	tom.fiers@uzgent.be
Comparison of three PCR-based assays for the non-invasive diagnosis of malaria: detection of Plasmodium parasites in blood and saliva	Singh R	ruchisp@gmail.com
Salivary and crevicular		

fluid interleukins in gingivitis	Montserrat Boronat-Catalá	montserrat.catala@uv.es
Usefulness of salivary alpha amylase as a biomarker of chronic stress and stress related oral mucosal changes – a pilot study	Ravindranath Vineetha	drvineetha@rediffmail.com