

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE ODONTOLOGIA

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

**BIOMARCADORES ORAIS NA DOENÇA DE ALZHEIMER**

CAROLINE MARTINS BRASIL

Porto Alegre

2021

CAROLINE MARTINS BRASIL

**BIOMARCADORES ORAIS NA DOENÇA DE ALZHEIMER**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do título de Cirurgiã-Dentista.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Rigon Zimmer

Porto Alegre

2021

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Adriana e Pedro, por estarem sempre comigo, me apoiarem em todos os momentos e não medirem esforços para possibilitar o meu crescimento, vocês fazem parte dessa conquista!

À minha irmã Déborah, por todo apoio, companheirismo e por passear com o Scott nos momentos em que não consegui. Tu é demais!

À minha família, por me darem apoio e compreenderem os momentos em que precisei me ausentar devido as demandas da Universidade.

Aos meus amigos, Emily Alves, Natália Kossmann, Débora Mendes, Priscila Silva, Luana Marques, Jonas César, Thais Marchand e Eduardo Guerrero por tornarem este momento um pouco mais leve. Os intervalos para descansar, tomar um café, conversar e rir juntos jamais serão esquecidos.

À equipe da Unidade de Saúde Timbaúva, por me acolherem durante o estágio e ao meu preceptor, Dionatã Trindade, por possibilitar o meu crescimento pessoal e profissional.

À minha orientadora da bolsa de extensão, Márcia Caçado, por me acolher com tanto amor e carinho como se fosse uma filha, por incentivar a publicação de artigos, a apresentação em diversos congressos pelo país e o meu crescimento profissional.

Ao meu orientador deste trabalho, Eduardo Zimmer, por me convidar para participar do Zimmer Lab e assim, me deixar cada vez mais encantada pela neurociência.

Aos meus colegas, professores e funcionários, que me ajudaram, de alguma forma, a chegar a este momento.

*“ O importante é não parar de questionar. A curiosidade tem sua própria razão de existência. Não se pode deixar de ficar admirado quando contempla os mistérios da eternidade, da vida, da maravilhosa estrutura da realidade. Basta que se busque compreender um pouco desse mistério a cada dia. Nunca perca a curiosidade, não pare de se maravilhar. ”*

*Albert Einstein*

## RESUMO

A doença de Alzheimer (DA) é uma condição neurodegenerativa progressiva, sendo caracterizada clinicamente pelo declínio cognitivo, ocasionando deterioração cerebral e incapacitação. A doença foi descoberta por Alois Alzheimer, psiquiatra alemão, que a descreveu como uma síndrome de demência progressiva, com alterações neuropatológicas associadas, que consistem na presença de placas de agregados proteicos, hoje conhecidos como as placas de beta-amiloide e os emaranhados neurofibrilares. Atualmente, marcadores biológicos (biomarcadores) de imagem e de fluidos biológicos (líquido cefalorraquidiano e plasma) têm sido utilizados visando um diagnóstico precoce da DA, de modo a possibilitar uma intervenção na fase pré-sintomática da doença. Esse trabalho teve como objetivo buscar na literatura o potencial de biomarcadores orais presentes na saliva no diagnóstico da DA e suas associações com biomarcadores já estabelecidos das patologias de amiloide e tau. Quanto a metodologia do estudo, foi realizada uma revisão de literatura na plataforma PubMed, em que encontramos 235 artigos que investigaram biomarcadores de saliva na DA. Esses artigos utilizaram os seguintes biomarcadores de interesse: GFAP, lactoferrina, análises proteômicas e metabolômicas, neurofilamentos, capacidade antioxidante salivar, acetilcolinesterase, A $\beta$ 42, metabólitos, microbioma, Tau, p-tau, t-tau, trealose, melatonina entre outros. Apesar das proteínas GFAP, lactoferrina, acetilcolinesterase, A $\beta$ 42, t-tau, p-tau, trealose e melatonina estarem alteradas em pacientes com a DA, esses biomarcadores não foram investigados em indivíduos na fase pré-clínica da DA (fase assintomática). Mais estudos são necessários para verificar a viabilidade do uso de biomarcadores de saliva no diagnóstico precoce da DA, tendo em vista que a descoberta é relativamente recente. Conclui-se que o diagnóstico precoce através de biomarcadores orais presentes na saliva deve ser explorado, tendo em vista que representa um método de coleta não invasivo, quando comparado a outros fluidos, como o sangue e líquido, e apresenta baixo custo, sendo mais acessível.

**Palavras-chave:** Doença de Alzheimer. beta-amiloide. Demência. Tau.

## ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is a progressive neurodegenerative condition clinically characterized by cognitive decline, which causes brain deterioration and disability. The disease was discovered by Alois Alzheimer, a German psychiatrist, who described it as a progressive dementia syndrome, with associated neuropathological changes, consisting of protein aggregates, known as beta-amyloid plaques neurofibrillary tangles. Currently, imaging and biological fluids (cerebrospinal fluid and plasma) biological markers (biomarkers) have been proposed for early diagnosing AD, which may enable intervention in the pre-symptomatic phase of the disease. This work aimed to search in the literature the potential of salivary biomarkers in the early diagnosis of AD and their associations with already established biomarkers of amyloid and tau pathologies. As for the study methodology, a literature review was performed on the PubMed platform, in which we found 235 articles that investigated salivary biomarkers in AD. These articles used the following biomarkers of interest: GFAP, lactoferrin, proteomic and metabolomic analysis, neurofilaments, salivary antioxidant capacity, acetylcholinesterase, A $\beta$ 42, metabolites, microbiome, p-tau, t-tau, trehalose, melatonin, among others. Although GFAP, lactoferrin, acetylcholinesterase, A $\beta$ 42, tau, t-tau, p-tau, trehalose and melatonin proteins are consistently altered in AD patients, these biomarkers have not been investigated in individuals in the preclinical phase of AD (asymptomatic phase). Considering that the advancements are relatively recent, more studies are needed to verify the feasibility of using saliva biomarkers in the early diagnosis of AD. Our literature review suggests that early diagnosis through salivary biomarkers should be explored, considering that it represents a non-invasive collection method, when compared to other fluids, such as blood and CSF, and, in addition, it has a low cost, being more affordable.

**Keywords:** Alzheimer's disease. Beta-amyloid peptides. Dementia. Tau.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Evolução patológica progressiva da doença de Alzheimer .....	15
Figura 2 – Fluxograma da revisão de literatura .....	18

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Biomarcadores salivares na doença de Alzheimer.....	19
--	----



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DA – Doença de Alzheimer

A $\beta$  – Proteína Beta-amiloide

APP – Proteína precursora de amiloide

LCR – Líquido cefalorraquidiano

PET – Tomografia por emissão de pósitrons

TC – Tomografia Computadorizada

RM – Ressonância Magnética

SNC – Sistema Nervoso Central

NMDA - N-metil-D-aspartato

AMPA – Ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4- isoxazolepropiónico

CO – Controle

CCL – Comprometimento cognitivo leve

GFAP – Proteína glial fibrilar ácida

AchE – Acetilcolinesterase

NfL – Neurofilamentos

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>11</b>
<b>2 OBJETIVOS DA REVISÃO</b> .....	<b>13</b>
2.1 OBJETIVOS GERAIS .....	13
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	13
<b>3 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>14</b>
3.1 A DOENÇA DE ALZHEIMER.....	14
3.2 MECANISMOS MOLECULARES .....	14
3.2.1 HIPÓTESE DA CASCATA AMILÓIDE .....	14
3.2.2 DISFUNÇÃO COLINÉRGICA.....	15
3.2.3 DISFUNÇÃO GLUTAMATÉRGICA.....	16
3.3 DIAGNÓSTICO .....	16
3.4 BIOMARCADORES .....	17
<b>4 METODOLOGIA</b> .....	<b>18</b>
<b>5 RESULTADOS</b> .....	<b>19</b>
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	<b>25</b>
<b>7 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>27</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>28</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O ato de envelhecer tem sido visto com maior naturalidade, à medida em que está aumentando a expectativa de vida e reduzindo a taxa de natalidade em diversos locais do mundo. No entanto, ainda há algumas doenças que estão diretamente relacionadas com o envelhecimento, como a doença de Alzheimer (DA).<sup>1</sup>

A DA é conhecida por ser uma desordem cognitiva e caracteriza-se pela perda de memória de forma progressiva, associada ao envelhecimento e trazendo diversas limitações para a vida da pessoa diagnosticada com a doença, pois nos estágios mais avançados, leva a esquecimentos de itens fundamentais, como nome dos filhos/netos, datas, locais por onde passou, mudanças de humor, etc. A doença torna a pessoa dependente de cuidadores ou familiares, pois ela já não consegue realizar funções diárias por si própria.<sup>1</sup>

O diagnóstico da DA é, muitas vezes, realizado de forma tardia, quando o paciente já se encontra em um estágio mais avançado da doença, ou seja, o prognóstico já é desfavorável, sendo o tratamento apenas para tentar melhorar os sintomas. O diagnóstico da doença no mundo ainda é bastante dependente da avaliação clínica. Entretanto, existem muitas iniciativas de pesquisa clínica que estão tentando biomarcadores de imagem e de biofluidos para um diagnóstico mais preciso.<sup>2</sup> De fato, biomarcadores para doenças neurodegenerativas são de fundamental importância para facilitar o diagnóstico da doença, sendo ideal em estágios iniciais, antes dos sintomas, de modo a possibilitar o monitoramento da progressão da doença e avaliar a resposta aos tratamentos farmacológicos.<sup>2</sup>

Ainda pouco explorada, mas de grande interesse, está a detecção precoce da doença através de biomarcadores orais presentes no fluido salivar. Essa matriz biológica é considerada promissora, pois é facilmente coletada. Além disso, o fluido salivar é complexo, apresentando funções biológicas, como no processo digestivo, lubrificação e proteção da cavidade oral, proteção de células gástricas e atuando na fisiologia esofágica.<sup>3</sup> A saliva é considerada um fluido sensível a alterações metabólicas, podendo ser utilizada para o diagnóstico de uma vasta quantidade de doenças.<sup>4</sup> Além disso, na saliva foram detectadas proteínas associadas a doenças neurodegenerativas.<sup>3</sup>

Baseado nisso, o objetivo desta revisão de literatura é buscar informações sobre o diagnóstico da DA através dos biomarcadores orais encontrados na saliva através de dados

obtidos na literatura, e ainda avaliar se existem evidências do seu uso para diagnóstico da DA na fase pré-clínica, antes do sintomas.

## **2 OBJETIVOS DA REVISÃO**

### **2.1 OBJETIVOS GERAIS**

Analisar os biomarcadores orais como método de diagnóstico para a doença de Alzheimer.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Relatar através de dados obtidos na literatura, se biomarcadores presentes na saliva são promissores no diagnóstico da DA.

### **3 REVISÃO DE LITERATURA**

#### **3.1 A DOENÇA DE ALZHEIMER**

Com o aumento da expectativa de vida, fenômeno mundial com significativo impacto na sociedade, observa-se uma maior incidência de doenças neurodegenerativas. A doença de Alzheimer (DA) é responsável por cerca de 50% dos casos de demência, sendo que em mais de 99% desses casos não há relação com a herança genética, mas sim, diretamente com a idade.<sup>5</sup> Atualmente, existem cerca de 35 milhões de pessoas com a DA e estimativas recentes sugerem que a prevalência de DA aumente em 3 vezes nos próximos 30 anos.<sup>5</sup>

A DA é uma condição neurodegenerativa, associada à idade e caracterizada pela deterioração cerebral progressiva, resultando em comprometimento cognitivo e evoluindo invariavelmente para incapacitação. As primeiras manifestações da doença incluem perda da memória de curto prazo, com preservação da memória de longo prazo até um determinado estágio da doença, dificuldade de atenção e fluência verbal, sendo que com o avanço dos estágios há deterioração das funções cognitivas, como a capacidade de utilizar objetos e a habilidade de realizar cálculos. Distúrbios de comportamento como depressão, hiperatividade, alucinações e irritabilidade também podem estar presentes.<sup>6</sup>

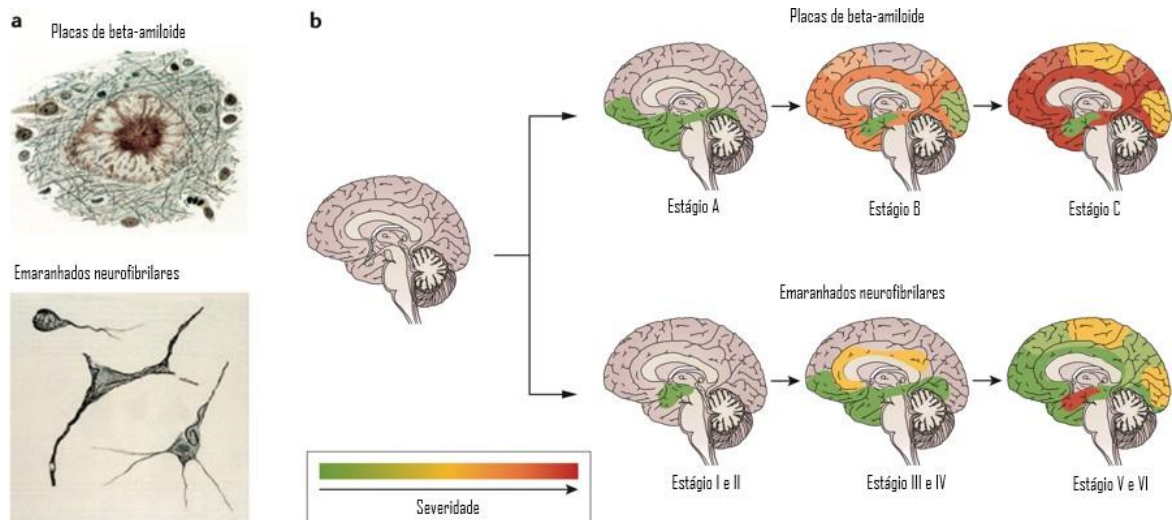
A DA descrita em 1906 por Alois Alzheimer, psiquiatra alemão, como uma síndrome de alterações progressivas em domínios cognitivos com alterações neuropatológicas associadas. Atualmente, essas características neuropatológicas são bem definidas: I) como as placas de beta-amiloide, formadas por depósitos insolúveis de peptídeos beta-amiloide; II) emaranhados neurofibrilares compostos de proteína tau hiperfosforilada.<sup>7</sup>

#### **3.2 MECANISMOS MOLECULARES**

##### **3.2.1 HIPÓTESE DA CASCATA AMILOIDE**

Evidências genéticas e neuropatológicas têm consistentemente apontado para um papel causal da deposição cerebral da proteína  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ) na DA, que é derivada da quebra da proteína precursora de amiloide (APP), a chamada “hipótese da cascata amiloide”<sup>8,9</sup>. Mais especificamente, o conhecimento atual sugere que a deposição de  $A\beta$  desencadeia uma cascata patológica que evolui para neurodegeneração e disfunção sináptica, clinicamente manifestada com declínio cognitivo e distúrbios neuropsiquiátricos e finalmente, demência. Apesar da

deposição de peptídeos  $A\beta$  sejam encontrados em indivíduos idosos saudáveis em pequenas quantidades.<sup>7</sup>



**Figura 1 – Evolução patológica progressiva da doença de Alzheimer.** a) Placas amiloides e emaranhados neurofibrilares, características clássicas da doença de Alzheimer, por marcação usando o método Bielschowsky. Esse método usa a impregnação de prata para visualizar as proteínas agregadas que constituem as placas de amiloide extracelulares e os emaranhados neurofibrilares de tau intracelulares. b) Em casos típicos da doença de Alzheimer, a deposição de amiloide  $\beta$  ( $A\beta$ ) precede a formação de emaranhados neurofibrilares com uma origem aparente nos lobos frontal e temporal, hipocampo e sistema límbico. Menos comumente, a doença pode emergir de outras regiões do neocórtex cerebral, como os lobos parietal e occipital, com preservação relativa do hipocampo. Os emaranhados neurofibrilares começam nos lobos temporais mediais e no hipocampo, e se espalham progressivamente para outras áreas do neocórtex. Com o advento de técnicas de neuroimagem com PET para  $A\beta$  e tau, a evolução longitudinal dessas alterações patológicas pode ser realizada em pacientes vivos em tempo real. Figura adaptada de Masters et al. 2015.<sup>10</sup>

### 3.2.2 DISFUNÇÃO COLINÉRGICA

A função colinérgica é importante no processo de memória e de aprendizagem, logo, a hipótese colinérgica relaciona a DA com a diminuição da concentração da colina acetiltransferase (AChT), que é a enzima responsável pela produção de acetilcolina (ACh), no hipocampo e no córtex.<sup>7</sup> O complexo colinérgico basal do cérebro, constituído pelo septo medial, banda diagonal horizontal e vertical de Broca, e o núcleo basal de Meynert, fornece as projeções colinérgicas do córtex cerebral e hipocampo.<sup>11</sup> Presume-se que os neurônios colinérgicos deste complexo sofram alterações neurodegenerativas moderadas durante o envelhecimento, no entanto, a perda neuronal de células foi predominante em processos patológicos, como na DA, sendo amplamente documentada uma grave perda de inervação

colinérgica cortical.<sup>11</sup> Nas fases iniciais da DA, aparentemente não há neurodegeneração colinérgica, mas perda da função colinérgica.<sup>11</sup>

### 3.2.3 DISFUNÇÃO GLUTAMATÉRGICA

A disfunção glutamatérgica consiste no fato de que o glutamato é o principal neurotransmissor do Sistema Nervoso Central (SNC). Este neurotransmissor é mediado por receptores ionotrópicos [N-metil-D-aspartato (NMDA), [ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiônico (AMPA) e o cainato (CAR)] e metabotrópicos (oito isoformas, mglu1-8).<sup>7</sup> Na DA, ocorre a ativação excessiva de receptores ionotrópicos, especialmente o NMDA, levando a alteração da homeostase de cálcio e, conseqüentemente, aumentando sua concentração intracelular, originando um processo de apoptose.<sup>7</sup>

## 3.3 DIAGNÓSTICO

Os critérios para diagnóstico da DA foram publicados pela primeira vez por McKhann et al. (1984)<sup>12</sup>, sendo predominantemente uma avaliação clínica, com poucos testes laboratoriais apenas utilizados para excluir outras causas de comprometimento cognitivo.<sup>13</sup> A confirmação diagnóstica só era possível no critério de 1984 após confirmação histopatológica da presença de placas amiloide (A $\beta$ ) e NTFs no tecido cerebral post-mortem. Após 30 anos, o critério de 2011 incluiu pela primeira vez o uso de biomarcadores – amiloide e tau - para auxiliar no diagnóstico clínico. É importante ressaltar o caráter progressivo da patologia, que envolve uma fase chama de comprometimento cognitivo leve (CCL) que precede a fase de demência.<sup>13</sup> Em 2018 surgiu um novo esquema de diagnóstico para pesquisa clínica proposto por Jack et al.<sup>14</sup>, que divide a patologia em biológica e clínica, sendo entidades diagnósticas independentes. A biológica é utilizada para o diagnóstico da patologia e a clínica para o estadiamento. O diagnóstico biológico proposto se baseia principalmente em biomarcadores para medir A $\beta$  (A), tau (T) e neurodegeneração (N), adotando uma classificação binária denominada A, T e N.<sup>13</sup>

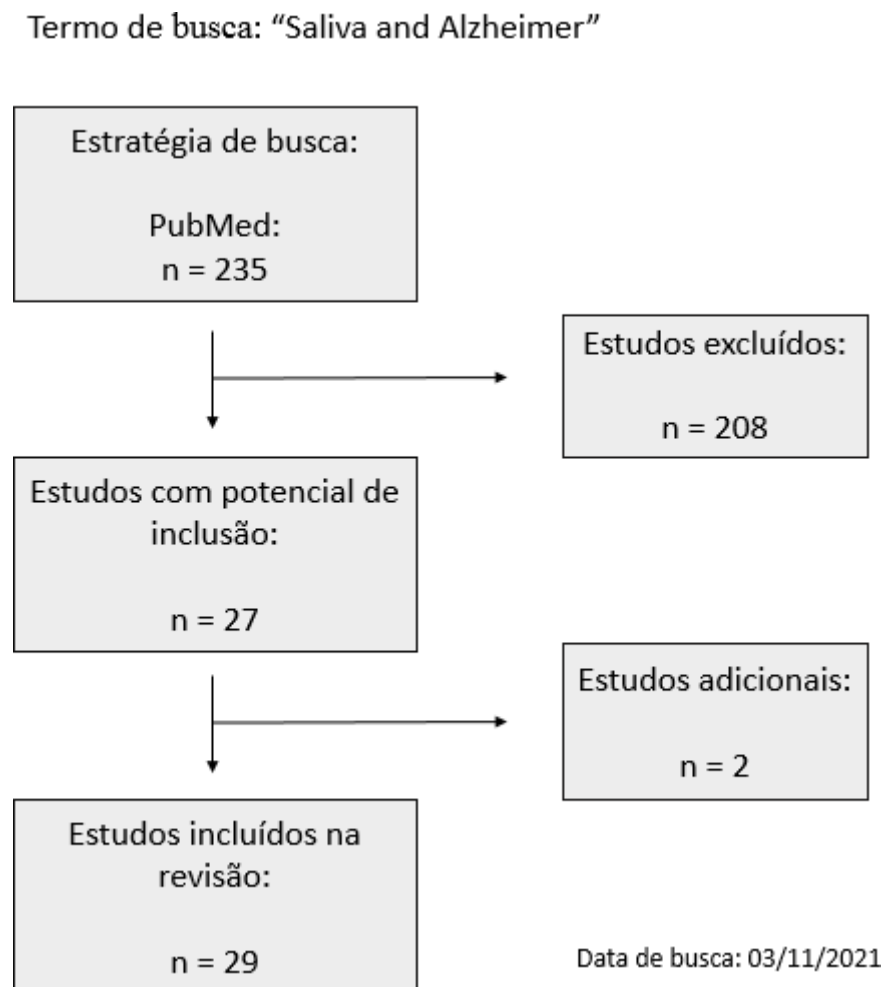


### **3.4 BIOMARCADORES**

Com o avanço no uso de biomarcadores se tornou possível o diagnóstico precoce da DA ou seja, antes do início dos sintomas. Acredita-se que a fase assintomática da DA comece cerca de 20-30 anos antes dos sintomas. Assim, os exames incluem a detecção de patologia amiloide, tau e neurodegeneração em líquido cefalorraquidiano (LCR) ou por exame de imagem via tomografia por emissão de pósitrons (PET).<sup>14</sup> Mais recentemente, o uso de biomarcadores no sangue (plasma ou soro) tem se mostrado eficazes para diagnosticar pacientes com a DA.<sup>15</sup>

## 4 METODOLOGIA

Foi realizada uma busca das palavras-chaves “Saliva and Alzheimer” no PubMed para identificar estudos clínicos utilizando saliva como biomarcador na doença de Alzheimer. Não utilizamos restrições de desenho de estudo, idioma ou data de publicação. A busca foi realizada no dia 03 de novembro de 2021. Foram identificados um total de 235 artigos. Após a leitura dos 235 resumos, foram excluídos 208 artigos, pois eram artigos em modelos animais, revisões ou que não versavam sobre o assunto desejado. Dois (2) artigos adicionais foram encontrados nas referências durante a revisão bibliográfica e foram incluídos. Por fim, 29 artigos foram lidos e criticamente avaliados.



**Figura 2. Fluxograma da revisão de literatura**

## 5 RESULTADOS

Abaixo na tabela 1, avaliamos os 29 artigos identificados na nossa busca que testaram biomarcadores em pacientes saudáveis ou com a doença de Alzheimer biológica ou clínica.

**Tabela 1. Biomarcadores salivares na doença de Alzheimer**

Estudo	Amostra (n)	Resultado
<b>GFAP</b>		
Katsipis et al. 2021 <sup>16</sup>	CO (20) CCL (20) DA (20)	Níveis reduzidos de GFAP em CCL e DA se comparados ao CO.
<b>Lactoferrina</b>		
Reseco et al. 2021 <sup>17</sup>	CO (74)	Níveis salivares de lactoferrina são sensíveis a variações na carga de A $\beta$ cortical.
Gleerup et al. 2021 <sup>18</sup>	CO (20) CCL (56) DA (71)	Níveis de lactoferrina no CSF e na saliva foram similares entre os grupos.
Bartolome et al. 2021 <sup>19</sup>	CO (10) DA(12)	Níveis aumentados de lactoferrina para DA se comparados ao CO.
Carro et al. 2017 <sup>20</sup>	Estudo 1:  CO (91) CCL (44) DA (80) Estudo 2: CO (40) CCL (15)	Níveis mais baixos de lactoferrina para DA e CCL se comparados ao CO.

	DA (36)	
<b>Análises proteômicas e metabolômicas</b>		
François et al. 2021 <sup>21</sup>	CO (40) CCL (20) DA (20)	Níveis de APOE 4 estão aumentados no grupo CCL e DA, se comparados ao CO. Os níveis de vitamina B12 foram maiores no grupo CCL e DA, quando comparados ao CO.  A vitamina D3 (coleciferol) estava aumentada apenas no grupo CCL quando comparado ao CO.
Contini et al. 2021 <sup>22</sup>	CO (34) DA (35)	Níveis aumentados de S100A8 e S100A9, $\alpha$ -defensinas 1-4, T $\beta$ 4, cistatinas A e B na DA se comparado ao CO.
<b>NfL (Neurofilamentos)</b>		
Gleerup et al. 2021 <sup>23</sup>	CO (17) CCL (47) DA (49)	Níveis de NfL foram similares entre os grupos.
<b>CAT (Capacidade total antioxidante)</b>		
Palomar-Bonet et al. 2021 <sup>24</sup>	CO (71)	Associação entre capacidade antioxidante total (CAT) salivar está positivamente associado com a deposição de amiloide no neocórtex e

		com o hipometabolismo de glicose em regiões corticais.
<b>Acetilcolinestese (AChE)</b>		
Bakhtiari et al. 2017 <sup>25</sup>	CO (15) DA (15)	Níveis elevados de AChE em pacientes com DA e CO foram similares.
Sayer et al. 2004 <sup>26</sup>	CO (11) DA (36)	Níveis diminuídos de AChE na DA, se comparado ao CO.
<b>Aβ42</b>		
Bermejo-Pareja et al. 2010 <sup>27</sup>	CO (56) DA (70)	Níveis de Aβ42 na DA leve/moderada > CO.
Lee et al. 2020 <sup>28</sup>	CO (27) DA (10)	Níveis de Aβ42 na DA > CO.
McGeer et al. 2020 <sup>29</sup>	CO (189) DA (30)	Níveis de Aβ42 na DA > CO.
Kim et al. 2014 <sup>30</sup>	CO (17) DA (28)	Níveis de Aβ42 na DA > CO.
Sabbagh et al. 2018 <sup>31</sup>	CO (7) DA (15)	Níveis de Aβ42 na DA > CO.

TvariJonaviciute et al. 2020 <sup>32</sup>	CO (83) DA (69)	Níveis reduzidos de A $\beta$ 42 e aumento do complemento C4 na DA, se comparado ao CO.
<b>Metabólitos</b>		
Liang et al. 2015 <sup>33</sup>	CO (218) DA (256)	Níveis mais altos de spinganina-1-fosfato e ornitina para DA se comparado ao grupo CO.  • Níveis mais baixos de inosina para DA se comparado ao grupo CO.
Marksteiner et al. 2019 <sup>34</sup>	CO (25) CCL (25) DA (25)	Diferenças significativas dos seguintes metabólitos para AD, se comparado ao grupo CO:  • PCae C34: 1-2 • PCae C36: 1-2-3 • PCae C38: 1c3 • PCae C40: 2-3
<b>Microbioma</b>		
Liu et al. 2019 <sup>35</sup>	CO (39) DA (39)	Níveis aumentados das seguintes bactérias para DA, se comparados ao grupo CO:  • <i>Moraxella</i> • <i>Leptotriquia</i> • <i>Sphaerochaeta</i>

		<ul style="list-style-type: none"> <li>Níveis mais baixos de <i>Rothia</i> para DA se comparado ao grupo CO.</li> </ul>
Bathini et al. 2020 <sup>36</sup>	CO (27) CCL (21) DA (17)	Níveis reduzidos de espécies patogênicas periodontais, como o <i>Filifactor villosus</i> , na DA se comparado ao grupo CCL e CO.
Palacio et al. 2018 <sup>37</sup>	DA leve (8) DA moderada (7) DA grave (22)	Níveis aumentados de crescimento microbiano, principalmente <i>Streptococcus mutans</i> e <i>Candida albicans</i> na DA.
<b>p-tau/t-tau</b>		
Ashton et al. 2018 <sup>38</sup>	CO (160)  CCL (68) DA (53)	Níveis de proteína Tau foram similares entre os grupos.
Santos et al. 2020 <sup>39</sup>	CO (60) DA (60)	Níveis reduzidos de proteína Tau em DA, se comparado ao grupo CO.
Shi et al. 2011 <sup>40</sup>	CO (38) DA (21)	Níveis aumentados de p-tau na DA, se comparado ao grupo CO.
Pekeles et al. 2018 <sup>41</sup>	CO (47) CCL(55) DA(46)	Níveis aumentados de p-tau e t-tau na DA, se comparado ao grupo CO.

<b>Trealose</b>		
Lau et al. 2015 <sup>42</sup>	CO (20) DA (20)	Níveis aumentados de trealose na DA, se comparado ao grupo CO.
<b>Melatonina</b>		
Manni et al. 2019 <sup>43</sup>	CO (17) DA (21)	Níveis reduzidos de melatonina na DA, se comparado ao grupo CO.
<b>Biomarcadores Múltiplos</b>		
Ralbovsky et al. 2019 <sup>44</sup>	CO (10) CCL (18) DA (11)	Análise de espectro com Raman utilizando saliva e aprendizado de máquina conseguiu diferenciar os grupos.



## 6 DISCUSSÃO

Esta revisão de literatura analisou os resultados de biomarcadores salivares em indivíduos com a DA. De acordo com o estudo de Katsipis et al. (2021), os níveis salivares de GFAP (proteína ácida fibrilar glial), principal constituinte do citoesqueleto astrocítico, foram encontrados diminuídos em pacientes com CCL e DA. O GFAP é uma proteína do citoesqueleto de astrócitos que parece vaziar para fluidos biológicos.<sup>13</sup>

A lactoferrina é uma proteína de ligação com o ferro, que apresenta atividade imunomoduladora.<sup>17</sup> No estudo de Carro et al. (2017), foram encontrados níveis salivares mais baixos em pacientes com a DA e CCL. No entanto, estudos mais recentes sugerem que não houve correlação entre os níveis de lactoferrina na DA e sugerem que fatores extrínsecos devem ser considerados na avaliação.

Quanto à proteômica (estudo das alterações das proteínas) e metabolômica (estudo da alteração dos metabólitos), foram encontradas alterações significativas em diversas vias celulares, demonstrando que a progressão da doença afeta em vários processos celulares.<sup>21</sup> No estudo de Liang et al. (2015), o principal contribuinte dos metabólitos para o modelo preditivo foi o esfingalina-1-fosfato, que foi regulado positivamente na DA, rendeu acurácia satisfatória, alta sensibilidade e especificidade, indicando potencial diagnóstico na DA. Esses metabólitos têm grande potencial para identificar biomarcadores úteis para o diagnóstico precoce e melhor prognóstico.<sup>33</sup> A metabolomia é uma abordagem promissora utilizada para compreender os mecanismos biológicos. Através de análises metabólicas não direcionadas e direcionadas, os metabólitos são determinados em amostras biológicas (fluidos, células, tecidos, etc.) por comparação de grupos de controle com grupos alterados.<sup>45</sup>

Nenhuma diferença significativa foi encontrada com relação nos níveis salivares de neurofilamento de cadeia leve (NfL), entretanto, observou-se um aumento significativo na concentração de NfL plasmático em pacientes com demência. O NfL tem sido sugerido como um biomarcador de neurodegeneração, pois se correlaciona com a lesão dos axônios neuronais. No entanto, NfL não se mostrou preciso o suficiente para diferenciar DA de CO na saliva.<sup>46</sup>

Os estudos que analisam a presença de AchE salivar sugerem que pode não servir como um biomarcador confiável, mesmo com a diminuição do AchE com a idade.<sup>26</sup> Outros fatores biológicos desempenham um papel em afetar níveis gerais de AchE no cérebro e na saliva, mas níveis salivares de AchE significativamente mais baixos podem servir como um método potencial de determinar o comprometimento do sistema colinérgico.<sup>25</sup>

Os estudos que analisaram a A $\beta$ 42 obtiveram resultados similares, em que os níveis de A $\beta$ 42 foram significativamente mais elevados em pacientes com DA com relação ao grupo controle, demonstrando que A $\beta$ 42 pode ser considerado um biomarcador em potencial para diagnóstico da DA.<sup>27</sup> Apenas um dos estudos encontrou níveis reduzidos de A $\beta$ 42 em pacientes com a DA, no entanto, a análise foi apenas em pacientes já diagnosticados com a doença, sendo necessários mais estudos comparando exames de imagem, coleta do LCR e os biomarcadores orais.<sup>32</sup>

Já quanto ao microbioma, algumas bactérias se expressaram em maior quantidade em pacientes com DA, como a *Moraxella*, *Leptotriquia* e *Sphaerochaeta* e foram encontrados níveis mais baixos de *Rothia* para pacientes com DA em relação ao grupo controle<sup>35</sup>. Houve um aumento significativo de bactérias da cavidade oral nos tecidos cerebrais de paciente com a DA, logo, a microbiota oral pode representar um papel importante na patogênese da doença.<sup>35</sup>

Sobre a proteína tau, dois estudos encontraram correlação entre níveis mais elevados de p-tau e t-tau no grupo com a DA.<sup>40,41</sup> Nesse sentido, os achados salivares acompanharam os achados em outros fluidos biológicos como LCR e sangue, onde p-tau e t-tau estão aumentadas.<sup>49,50,51</sup>

Recentemente, foram encontrados níveis mais elevados de açúcares salivares em pacientes com DA, logo, o estudo de Lau et al. (2015) analisou a presença de trealose salivar, dissacarídeo que serve como fonte de energia e protetor contra os efeitos da desidratação<sup>52</sup>, sendo encontrados níveis mais elevados de trealose em pacientes com DA em relação ao grupo controle, sendo uma forte indicação de que pacientes com DA apresentam maior taxa de açúcares salivares se comparado ao grupo controle.<sup>42</sup> Já a melatonina, conhecida por ser um hormônio promotor do sono e por ter propriedades anti-inflamatórias cerebrais<sup>53</sup>, foi encontrada em concentrações mais baixas nos pacientes com a DA em relação ao grupo controle.<sup>43</sup>

O estudo de Santos, Olave e Pardi (2020) investigou a concentração de proteína Tau e A $\beta$  na saliva de pacientes com a DA e constatou que a concentração de proteína Tau foi significativamente mais baixa em pacientes com a DA, entretanto, não foram identificadas diferenças na concentração salivar da A $\beta$ .<sup>39</sup>

No estudo de Palacio et al. (2018), foi observado que a DA pode afetar o fluxo salivar dos pacientes, no entanto, fatores como o envelhecimento e o uso de fármacos que reduzem o fluxo salivar devem ser considerados. Foram constatados altos níveis de crescimento microbiano nos participantes do estudo, como de *streptococcus mutans* e *cândida albicans*, que podem estar relacionados a redução da motricidade no idoso e a dificuldade de higienização dentária e das próteses.<sup>37</sup> Há diferenças significativas na concentração de metabólitos salivares em pacientes com a doença com relação aos pacientes saudáveis.<sup>54</sup>

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O uso da saliva como matriz biológica é de bastante interesse no diagnóstico da DA, pois é um método não-invasivo e de baixo custo. Apesar dos estudos estarem em início de desenvolvimento e validação, a saliva parece ser uma matriz biológica potencial para detecção da DA. Nesse sentido, os biomarcadores descritos como potenciais são a lactoferrina, devendo-se considerar fatores extrínsecos nos próximos estudos; a A $\beta$ 42, em que a maioria dos estudos demonstrou níveis mais elevados nos grupos com a DA, com relação ao grupo controle; a melatonina, GFAP, proteína p-tau, t-tau, acetilcolinesterase, trealose e o microbioma oral, no entanto, mais estudos são necessários para aprofundar esta associação. A partir desses resultados, o investimento na pesquisa, de forma a produzir mais estudos, são importantes pois a saliva é uma matriz de coleta fácil e não invasiva e permite o desenvolvimento de estudos de larga escala a nível populacional.

## REFERÊNCIAS

1. BURLÁ, C. et al. Envelhecimento e doença de Alzheimer: reflexões sobre autonomia e o desafio do cuidado. **Revista Bioética**, Rio de Janeiro, v. 22, n. 1, p. 85–93, abr. 2014. DOI:10.1590/S1983-80422014000100010. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/bioet/a/kjBjVtHF4qHT7s4VX5FtR8r/?lang=pt#>. Acesso em: 07 nov. 2021.
2. SHI, M.; CAUDLE, W. M.; ZHANG, J. Biomarker discovery in neurodegenerative diseases: A proteomic approach. **Neurobiology of Disease**, Seattle, v. 35, n. 2, p. 157–164, ago. 2009. DOI: 10.1016/j.nbd.2008.09.004. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2939006/>. Acesso em: 05 ago. 2021.
3. AZEVEDO, D. F. S. Biomarcadores salivares para diagnóstico de doenças sistêmicas e psicoemocionais. **Mestrado Integrado em Medicina Dentária**. Instituto Universitário Egas Moniz. p. 42. Set. 2020.
4. FIGUEIRA, J.; JONSSON, P.; ADOLFSSON, A. N.; ADOLFSSON, R.; NYBERG, L.; ÖHMAN, A. NMR analysis of the human saliva metabolome distinguishes dementia patients from matched controls. **Mol. BioSyst.**, v. 12, n. 8, p. 10, 2016. DOI: 10.1039/c6mb00233a. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27265744/>. Acesso em: 05 ago. 2021.
5. ALZHEIMER'S ASSOCIATION. 2015 Alzheimer's disease facts and figures. **Alzheimer's Dement.** 2015 Mar;11(3):332-84. DOI: 10.1016/j.jalz.2015.02.003. PMID: 25984581.
6. SERENIKI, A.; VITAL, M. A. B. F. A doença de Alzheimer: aspectos fisiopatológicos e farmacológicos. **Revista de Psiquiatria do Rio Grande do Sul**, v. 30, n. 1 suppl, 2008.
7. FALCO, A. D. et al. ALZHEIMER'S DISEASE: ETIOLOGICAL HYPOTHESES AND TREATMENT PERSPECTIVES. **Química Nova**, 2015.
8. HARDY, J. A.; HIGGINS, G.A. Alzheimer's Disease: The Amyloid Cascade Hypothesis. **Science**, v.256. p.184, apr. 1992.
9. HARDY, J.; SELKOE, D.J. The Amyloid Hypothesis of Alzheimer's Disease: Progress and Problems on the Road to Therapeutics. **Science**, v. 297, n. 5580, p. 353–356, 19 jul. 2002
10. MASTERS, C. et al. Alzheimer's disease. **Nat Rev Dis Primers** 1, 15056 (2015). <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.56>
11. SCHLIEBS, R.; ARENDT, T. The cholinergic system in aging and neuronal degeneration. **Behavioural Brain Research**, v. 221, n. 2, p. 555–563, ago. 2011.
12. MCKHANN, G. et al. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. **Neurology** 34, p. 939–944, 1984.
13. CARTER, S. F. et al. Astrocyte Biomarkers in Alzheimer's Disease. **Trends in Molecular Medicine**, v. 25, n. 2, p. 77–95, fev. 2019.

14. JACK, C. R. et al. NIA-AA Research Framework: Toward a biological definition of Alzheimer's disease. **Alzheimer's & Dementia**, v. 14, n. 4, p. 535–562, abr. 2018.
15. TOOMBS, J.; ZETTERBERG, H. In the blood: biomarkers for amyloid pathology and neurodegeneration in Alzheimer's disease. **Brain Communications**, v. 2, n. 1, p. 54, 1 jan. 2020.
16. KATSIPIIS, G.; TZEKAKI, E. E.; TSOLAKI, M.; PANTAZAKI, A. A. Salivary GFAP as a potential biomarker for diagnosis of mild cognitive impairment and Alzheimer's disease and its correlation with neuroinflammation and apoptosis. **J Neuroimmunol**. 2021 Oct 9;361:577744. doi: 10.1016/j.jneuroim.2021.577744. Epub ahead of print. PMID: 34655990.
17. RESECO, L.; ATIENZA, M.; FERNANDEZ-ALVAREZ, M.; CARRO, E.; CANTERO, J. L. Salivary lactoferrin is associated with cortical amyloid-beta load, cortical integrity, and memory in aging. **Alzheimers Res Ther**. 2021 Sep 6;13(1):150. doi: 10.1186/s13195-021-00891-8. PMID: 34488875; PMCID: PMC8422723.
18. GLEERUP, H. S.; JENSEN, C. S.; HOGH, P.; HASSELBALCH, S. G.; SIMONSEN, A. H. Lactoferrin in cerebrospinal fluid and saliva is not a diagnostic biomarker for Alzheimer's disease in a mixed memory clinic population. **EBioMedicine**. 2021 May;67:103361. doi: 10.1016/j.ebiom.2021.103361. Epub 2021 May 8. PMID: 33975253; PMCID: PMC8122152.
19. BARTOLOME, F.; ORIVE, G.; CARRO, E. Standardizing salivary lactoferrin measurements to obtain a robust diagnostic biomarker for Alzheimer's disease. **Alzheimers Dement (Amst)**. 2021 May 2;13(1):e12173. doi: 10.1002/dad2.12173. PMID: 33969170; PMCID: PMC8088590.
20. CARRO, E.; BARTOLOME, F.; BERMEJO-PAREJA, F. et al., "Early diagnosis of mild cognitive impairment and Alzheimer's disease based on salivary lactoferrin," **Alzheimer's & Dementia: Diagnosis, Assessment & Disease Monitoring**, vol. 8, p. 131–138, 2017.
21. FRANÇOIS, M. et al. Salivaomics as a Potential Tool for Predicting Alzheimer's Disease During the Early Stages of Neurodegeneration. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 82, n. 3, p. 1301–1313, 3 ago. 2021.
22. CONTINI, C.; OLIANAS, A.; SERRAO, S.; DERIU, C.; LAVARONE, F.; BOROUMAND, M.; BIZZARRO, A.; LAURIA, A.; FAA, G.; CASTAGNOLA, M.; MESSANA, I.; MANCONI, B.; MASULLO, C.; CABRAS, T. Top-Down Proteomics of Human Saliva Highlights Anti-inflammatory, Antioxidant, and Antimicrobial Defense Responses in Alzheimer Disease. **Front Neurosci**. 2021 May 26;15:668852. doi: 10.3389/fnins.2021.668852. Erratum in: *Front Neurosci*. 2021 Aug 13;15:743596. PMID: 34121996; PMCID: PMC8189262.
23. GLEERUP, H.S.; SANNA, F.; HOGH, P.; SIMRÉN, J.; BLENNOW, K.; ZETTERBERG, H.; HASSELBALCH, S.G.; ASHTON, N. J.; SIMONSEN, A. H. Saliva Neurofilament Light Chain Is Not a Diagnostic Biomarker for Neurodegeneration in a Mixed Memory Clinic Population. **Front Aging Neurosci**. 2021 May 10;13:659898. doi: 10.3389/fnagi.2021.659898. PMID: 34040512; PMCID: PMC8141589.
24. PALOMAR-BONET, M.; ATIENZA, M.; HERNÁNDEZ-LEDESM, B.; CANTERO, J. L. Associations of Salivary Total Antioxidant Capacity With Cortical Amyloid-Beta Burden,

- Cortical Glucose Uptake, and Cognitive Function in Normal Aging. **J Gerontol A Biol Sci Med.** 2021 Sep 13;76(10):1839-1845. doi: 10.1093/gerona/glab034. PMID: 33522564.
25. BAKHTIARI, S., MOGHADAM, N. B., EHSANI, M., MORTAZAVI, H.; SABOUR, S.; BAKHSHI, M. Can Salivary Acetylcholinesterase be a Diagnostic Biomarker for Alzheimer?. **Journal of clinical and diagnostic research : JCDR**, 2017;11(1), ZC58–ZC60. doi:10.7860/JCDR/2017/21715.9192
26. SAYER, R. et al. Association of a salivary acetylcholinesterase with Alzheimer's disease and response to cholinesterase inhibitors. **Clinical Biochemistry**, v. 37, n. 2, p. 98–104, fev. 2004.
27. BERMEJO-PAREJA, F.; ANTEQUERA, D.; VARGAS, T.; MOLINA, J. A.; CARRO, E. Saliva levels of Abeta1-42 as potential biomarker of Alzheimer's disease: a pilot study. **BMC neurology**, 2010;10, 108. doi:10.1186/1471-2377-10-108
28. LEE, M.; GUO, J. P.; KENNEDY, K.; MCGEER, E. G.; MCGEER, P. L. McGeer, "A method for diagnosing Alzheimer's disease based on salivary amyloid- $\beta$  protein 42 levels," **Journal of Alzheimer's Disease**, vol. 55, no. 3, pp. 1175–1182, 2017.
29. MCGEER, P. L.; LEE, M.; KENNEDY, K.; MCGEER, E. G. Saliva Diagnosis as a Disease Predictor. **Journal of clinical medicine**, 2020;9(2), 377. doi: 10.3390/jcm9020377
30. KIM, C. B.; CHOI Y. Y.; SONG W. K.; SONG, K. B. "Antibody based magnetic nanoparticle immunoassay for quantification of Alzheimer's disease pathogenic factor," **Journal of Biomedical Optics**, vol. 19, no. 5, article 051205, 2014.
31. SABBAGH, M. et al. "Salivary beta amyloid protein levels are detectable and differentiate patients with Alzheimer's disease dementia from normal controls: preliminary findings," **BMC Neurology**, vol. 18, no. 1, p. 155, 2018.
32. TVARIJONAVICIUTE, A.; ZAMORA, C.; CERÓN, J. J.; BRAVO-CANTERO, A. F.; PARDO-MARÍN, L.; VALVERDE, S.; LÓPEZ-JORNET, P. Salivary biomarkers in Alzheimer's disease. **Clinical Oral Investigations**, 2020;1 - 8. doi: 10.1007/s00784-020-03214-7
33. LIANGA, Q.; LIU, H.; ZHANG, T.;JIANG, Y.;XING, H.; ZHANG, A. H. "Metabolomics-based screening of salivary biomarkers for early diagnosis of Alzheimer's disease," **RSC Advances**, vol. 5,no. 116, pp. 96074–96079, 2015.
34. MARKSTEINER, J.; OBERACHER, H.; HUMPEL, C. Acyl-Alkyl-Phosphatidylcholines are Decreased in Saliva of Patients with Alzheimer's Disease as Identified by Targeted Metabolomics. **Journal of Alzheimers Disease**, 2019;68(2), 583–589. doi: 10.3233/jad-181278.
35. LIU, X. X. et al. Analysis of Salivary Microbiome in Patients with Alzheimer's Disease. **J Alzheimers Dis.** 2019;72(2):633-640. doi:10.3233/JAD-190587.
36. BATHINI, P. et al. Classifying dementia progression using microbial profiling of saliva. **Alzheimer's Dement.** 2020; 12:e12000. doi: 10.1002/dad2.12000.
37. PALACIO et al. Salivary characteristics in patients with familial alzheimer's disease due to e280a mutation. **Revista Facultad de Odontología**, 1 jan. 2018. doi:10.17533/udea.rfo.v29n2a6

38. ASHTON, N. J. et al., “No association of salivary total tau concentration with Alzheimer’s disease,” **Neurobiology of Aging**, v. 70, pp. 125–127, 2018.
39. SANTOS, G. A. A.; OLAVE, E.; PARDI, P. C. Salivary Biomarkers in Alzheimer’s Disease. v.28, n.1. p. 5, 2020.
40. SHI, M. et al. “Salivary tau species are potential biomarkers of Alzheimer’s disease,” **Journal of Alzheimer’s Disease**, vol. 27, n. 2, p. 299–305, 2011.
41. PEKELES, H.; QURESHI, H. Y.; PAUDEL, H. K.; SCHIPPER, H. M.; GORNISTKY, M.; CHERTKOW, H. “Development and validation of a salivary tau biomarker in Alzheimer’s disease,” **Alzheimer’s & Dementia: Diagnosis, Assessment & Disease Monitoring**, vol. 11, pp. 53–60, 2018.
42. LAU, H. C. et al. “Non-invasive screening for Alzheimer’s disease by sensing salivary sugar using *Drosophila* cells expressing gustatory receptor (Gr5a) immobilized on an extended gate ion-sensitive field-effect transistor (EGISFET) biosensor,” **PLoS One**, v. 10, n. 2, article e0117810, 2015.
43. MANNI, R. et al. Evening melatonin timing secretion in real life conditions in patients with Alzheimer disease of mild to moderate severity. **Sleep Med.** 2019;63:122-126. doi:10.1016/j.sleep.2019.04.018.
44. RALBOVSKY, N. M.; HALÁMKOVÁ, L.; WALL, K.; ANDERSON-HANLEY, C.; LEDNEV, I. K. Screening for Alzheimer’s Disease Using Saliva: A New Approach Based on Machine Learning and Raman Hyperspectroscopy. **J Alzheimers Dis.** 2019;71(4):1351-1359. doi:10.3233/JAD-190675.
45. CANUTO, G. et al. METABOLÔMICA: DEFINIÇÕES, ESTADO-DA-ARTE E APLICAÇÕES REPRESENTATIVAS. **Química Nova**, 2017.
46. KHALIL, M. et al. Serum neurofilament light levels in normal aging and their association with morphologic brain changes. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 812, dez. 2020.
47. THIJSEN, E. H. et al. Highly specific and ultrasensitive plasma test detects Aβ(1–42) and Aβ(1–40) in Alzheimer’s disease. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 9736, dez. 2021.
48. ANDREASEN, N. et al. Cerebrospinal Fluid h-Amyloid(1-42) in Alzheimer Disease. **ARCH NEUROL**, v. 56, p. 8, 1999.
49. FYFE, I. Tau species has potential for Alzheimer disease blood test. **Nature Reviews Neurology**, v. 16, n. 10, p. 521–521, out. 2020.
50. KARIKARI, T. K. et al. Blood phosphorylated tau 181 as a biomarker for Alzheimer’s disease: a diagnostic performance and prediction modelling study using data from four prospective cohorts. **The Lancet Neurology**, v. 19, n. 5, p. 422–433, maio 2020.
51. WATTMO, C.; BLENNOW, K.; HANSSON, O. Cerebro-spinal fluid biomarker levels: phosphorylated tau (T) and total tau (N) as markers for rate of progression in Alzheimer’s disease. **BMC Neurology**, v. 20, n. 1, p. 10, dez. 2020.

52. RICHARDS, A. B. et al. Trehalose: a review of properties, history of use and human tolerance, and results of multiple safety studies. **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, n. 7, p. 871–898, jul. 2002.
53. LIN, S. H.; GALET, C.; ZANATY, M.; BAYMAN, E.; ROGERS, W. K.; HASAN, D.; ALLAN, L. D. Melatonin and risk of mortality in subjects with aneurysmal subarachnoid hemorrhage. **Clin Neurol Neurosurg**. 2021 Oct 13;210:106990. doi: 10.1016/j.clineuro.2021.106990. Epub. PMID: 34739880.
54. YILMAZ, A. et al. Diagnostic Biomarkers of Alzheimer's Disease as Identified in Saliva using 1H NMR-Based Metabolomics. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 58, n. 2, p. 355–359, 11 maio 2017.