



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Ciências da Saúde

**Perfil metabolómico da saliva:
potencial no diagnóstico da doença de Parkinson**

Mauro Rúben Marques Sousa

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em

Medicina

(ciclo de estudos integrado)

Orientador: Prof. Doutora Carla Fonseca

Coorientador: Prof. Doutora Maria Luiza Rosado

Coorientador: Prof. Doutor Jorge Manuel dos Reis Gama

Covilhã, maio de 2017

Agradecimentos

À Prof^a. Doutora Carla Fonseca que acompanhou toda a investigação, pelo apoio e disponibilidade prestada.

À Prof^a Doutora Luiza Rosado pela colaboração, apoio e motivação.

Ao Prof. Doutor Jorge Manuel dos Reis Gama pelo acompanhamento da investigação, pela simpatia, paciência e disponibilidade.

Ao CICS pela disponibilização das suas infraestruturas e material, bem como o apoio dos investigadores que o compõem.

À equipa médica de Neurologia do Centro Hospitalar da Cova da Beira, que contribuiu para o crescimento e enriquecimento deste trabalho.

À equipa médica de Urologia e ao Dr. Humberto Gonçalves, pela disponibilidade e apoio concedidos à minha proposta.

Aos profissionais do sector 1, sector 2 e sector da Ginecologia, da Consulta Externa do Centro Hospitalar da Cova da Beira, pela disponibilidade e apoio prestados.

À equipa da biblioteca do CHCB, Dra Rosa Saraiva por todo o apoio prestado.

À minha família que sempre me apoiaram em todos os momentos e por permitirem realizar este sonho.

À Patrícia Valério por me ajudar, motivar diariamente, pela paciência e por acreditar sempre em mim.

Aos meus amigos pelo apoio e motivação.

A todos os participantes deste estudo.

Resumo

A doença de Parkinson (DP) é classicamente identificada como uma doença motora, começando anos antes do início dos sintomas motores, quando a sintomatologia inespecífica se encontra já presente. O diagnóstico é feito exclusivamente através de critérios clínicos, sendo difícil nos estágios iniciais da doença. Portanto, a identificação de biomarcadores da DP melhoraria o diagnóstico e, possivelmente, a sua deteção precoce.

A análise do perfil metabolómico tornou-se uma ferramenta poderosa na identificação de novos biomarcadores de várias patologias em diferentes fluidos biológicos. A saliva tem um enorme potencial como fluido para diagnóstico, uma vez que a sua colheita é simples, não invasiva e de baixo custo. Na DP existe um aumento na salivacção e alguns estudos mostraram o envolvimento das glândulas salivares na sua fisiopatologia. Além disso, os níveis de α -sinucleína na saliva estão significativamente mais baixos em doentes de Parkinson. Considerando estas observações e para determinar o potencial da saliva no diagnóstico da DP, o presente estudo teve como objetivos (1) analisar o perfil metabolómico de amostras de saliva obtidas de doentes de Parkinson e indivíduos saudáveis e (2) avaliar se esse perfil poderá ser utilizado para discriminar estes dois grupos e auxiliar no diagnóstico da DP.

O estudo incluiu 25 doentes de Parkinson da consulta de Neurologia do Centro Hospitalar Cova da Beira e 26 indivíduos saudáveis. Foram colhidas amostras de saliva não estimulada, à temperatura ambiente, e a todos os indivíduos foi solicitado que não comessem, bebessem, lavassem a cavidade oral ou fumassem nas duas horas anteriores (no mínimo). As amostras de saliva foram analisadas por espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN). Utilizou-se a análise estatística multivariada para analisar os espectros de RMN de ^1H e identificar características espectrais que possam diferenciar doentes de Parkinson de indivíduos saudáveis. Os nossos resultados mostram que a saliva de doentes de Parkinson apresenta um perfil metabólico distinto quando comparado com os controlos, com diferentes metabolitos a contribuir para essa discriminação.

Apesar da amostra reduzida utilizada no presente estudo, este poderá contribuir para a identificação de possíveis biomarcadores para o diagnóstico da DP.

Palavras-chave

Doença de Parkinson, saliva, metabolómica, Ressonância Magnética Nuclear, biomarcadores

Abstract

Parkinson's disease (PD) is classically identified as a motor disease, starting years before the onset of motor symptoms, when unspecific symptomatology is present. Diagnosis is made exclusively through clinical criteria, being difficult in the early stages of the disease. Therefore, the identification of biomarkers of PD would improve diagnosis and, possibly, its earlier detection.

Metabolic profiling has become a powerful tool to identify new biomarkers of several pathologies in different biofluids. Saliva has an enormous potential as a diagnostic fluid, given the simplicity, non-invasiveness and low-cost of its collection. On PD there is an increase in salivation and some studies show the involvement of salivary glands in its pathophysiology. Also, salivary α -synuclein levels are significantly lower in PD patients. Considering these findings, and in order to determine the potential of saliva in the diagnosis of PD, in the present study we aimed at (1) analysing the metabolic profile of saliva samples obtained from PD and healthy subjects and (2) to assess if it could be used to differentiate between these two groups and help in the diagnosis of PD.

The study included 25 PD patients from the Neurology appointment of the Centro Hospitalar Cova da Beira and 26 healthy individuals. Unstimulated saliva samples were collected at room temperature and all subjects were unable to eat, drink, wash the oral cavity or smoke in the preceding 2 hours (minimum). Saliva samples were analysed using Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectroscopy. Multivariate statistical analysis was employed to analyse ^1H NMR spectra and identify spectral characteristics that could differentiate PD from healthy subjects. Our results show that saliva from PD patients presents a distinct metabolic profile when compared to controls, with different metabolites contributing for this discrimination.

Despite the reduced sample used in this study, it may constitute a step towards the identification of possible biomarkers for PD diagnosis.

Keywords

Parkinson's disease, saliva, metabolomics, Nuclear Magnetic Resonance, biomarkers

Índice

Agradecimentos	ii
Resumo	iii
Palavras-chave	iii
Abstract	iv
Keywords	iv
Índice	v
Lista de Figuras	vii
Lista de Tabelas	viii
Lista de Acrónimos	ix
1. Introdução	1
2. Material e Métodos	3
2.1. Aprovação Ética	3
2.2. Seleção dos indivíduos para estudo	3
2.2.1. Seleção dos doentes de Parkinson	3
2.2.2. Seleção dos Controlos	5
2.2.3. Outros critérios de exclusão	6
2.3. Colheita e preparação da amostra de saliva	6
2.4. Espectros de RMN ¹ H e identificação de metabolitos	7
2.4.1. Espectros RMN de ¹ H unidimensionais	7
2.4.2. Espectros RMN bidimensionais - <i>J-resolved</i>	7
2.4.3. Testes de estabilidade e reprodutibilidade	8
2.4.4. Identificação dos metabolitos	8
2.5. Análise estatística	8
2.5.1. Divisão em subgrupos	8
2.5.2. Estatística descritiva e inferencial	8
2.5.3. Análise Estatística Multivariada	9
2.5.3.1. Análises discriminativas entre grupos	10
2.5.4. Regressão logística complementar	10
3. Resultados	11
3.1. Características demográficas da amostra em estudo	11
3.1.1. Grupo de doentes de Parkinson	12
3.2. Espectros RMN ¹ H e identificação de metabolitos	14
3.2.1. Estabilidade e Reprodutibilidade	14
3.2.2. Identificação dos metabolitos	14

3.3. Análise Estatística Multivariada - sPLS-DA.....	15
3.3.1. Análise discriminativa entre o grupo de doentes de Parkinson e o grupo Controlo	15
3.3.1.1. Discriminação cruzada entre componentes	16
3.3.1.2. Componentes: metabolitos e curvas ROC	17
3.3.2. Análise discriminativa, sexo Masculino	20
3.3.2.1. Discriminação cruzada entre componentes: sexo Masculino.....	20
3.3.2.2. Componentes, sexo Masculino: metabolitos e curvas ROC	22
3.3.3. Análise discriminativa, sexo Feminino.....	24
3.3.3.1. Discriminação cruzada entre componentes: sexo Feminino	24
3.3.3.2. Componentes, sexo Feminino: metabolitos e curvas ROC.....	26
3.3.4. Análise discriminativa, subgrupos	27
3.3.4.1. Discriminação cruzada entre componentes: subgrupos.....	28
3.3.4.2. Componentes subgrupos: metabolitos e curvas ROC	29
3.4. Análise complementar com regressão logística	33
3.4.1. Grupo doentes de Parkinson <i>versus</i> Grupo Controlo	33
3.4.2. Grupo doentes de Parkinson <i>versus</i> Grupo Controlo, sexo Masculino.....	34
3.4.3. Grupo doentes de Parkinson <i>versus</i> Grupo Controlo, sexo Feminino	34
3.4.4. Grupo doentes de Parkinson <i>versus</i> Grupo Controlo, subgrupos DP.....	35
4. Discussão	38
Bibliografia.....	42
Anexo 1 - Aprovação da Comissão de Ética do CHCB	46
Anexo 2 - Consentimento Informado aplicado aos doentes de Parkinson e Controlos	49
Anexo 3 - Questionário aplicado aos doentes de Parkinson	51
Anexo 4 - Questionário aplicado aos Controlos	54
Anexo 5 - Dados relativos ao grupo de doentes de Parkinson.....	57
Anexo 6 - Dados relativos ao grupo Controlo	63
Anexo 7 - Loadings das 72 regiões do espectro de RMN, componente 2, grupo doentes de Parkinson <i>versus</i> grupo Controlo	67
Anexo 8 - Metabolitos identificados e sua representação no espectro de RMN	69

Lista de Figuras

Figura 1 - Proposta de evolução da doença de Parkinson.	1
Figura 2 - Espectro de RMN de ^1H unidimensional diferentes tempos de aquisição.....	14
Figura 3 - Análises sPLS-DA discriminação cruzada componentes 1 e 2, grupo doentes de Parkinson versus grupo Controlo	16
Figura 4 - Análises sPLS-DA discriminação cruzada componentes 1 e 3, grupo doentes de Parkinson versus grupo Controlo	17
Figura 5 - Curva ROC para a componente 1, grupo de doentes de Parkinson <i>versus</i> grupo Controlo.	18
Figura 6 - Espectro de RMN de ^1H , metabolitos não identificados X_1 e X_2	19
Figura 7 - Análises sPLS-DA discriminação cruzada componentes 1 e 2, sexo Masculino.....	21
Figura 8 - Análises sPLS-DA discriminação cruzada componentes 1 e 3, sexo Masculino.	21
Figura 9 - Espectro de RMN ^1H , regiões diferenças na linha de base. Z_1 , Z_2 e Z_3	23
Figura 10 - Análises sPLS-DA discriminação cruzada componentes 1 e 3, sexo Feminino.	25
Figura 11 - Análises sPLS-DA discriminação cruzada componentes 1 e 2, sexo Feminino.	25
Figura 12 - Espectro de RMN de ^1H , regiões diferenças na linha de base Z_3	27
Figura 13 - Análises sPLS-DA discriminação cruzada componentes 1 e 2, subgrupos DP	28
Figura 14 - Análises sPLS-DA discriminação cruzada componentes 1 e 3, subgrupos DP	29
Figura 15 - Espectro de RMN de ^1H , metabolito não identificado X_3	30
Figura 16 - Espectro de RMN de ^1H , metabolito não identificado X_4	31
Figura 17 - Espectro de RMN de ^1H , dois metabolitos não identificados, X_5 , e regiões diferenças na linha de base Z_4	32
Figura 18 - Evolução das probabilidades estimadas para cada uma das categorias dos subgrupos da DP.....	37
Figura 19 - Loadings das 72 regiões do espectro de RMN, componente 2	68
Figura 20 - Espectro de RMN de ^1H , 1D (A) e espectro de RMN JRES, 2D (B).....	71
Figura 21 - Espectro de RMN de ^1H com metabolitos identificados	71
Figura 22 - Espectro de RMN de ^1H fracionado com metabolitos identificados.....	71

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Critérios do <i>United Kingdom Parkinson's Disease Society Brain Bank</i>	4
Tabela 2 - Escala <i>Hoehn e Yahr</i> modificada	4
Tabela 3 - Descrição demográfica da população em estudo	12
Tabela 4 - Caracterização do grupo de doentes de Parkinson	13
Tabela 5 - Metabolito discriminatório da componente 1, grupo doentes de Parkinson <i>versus</i> grupo Controlo	17
Tabela 6 - Metabolitos discriminatórios da componente 2, grupo doentes de Parkinson <i>versus</i> grupo Controlo	18
Tabela 7 - Metabolito que contribui para componente 3, grupo doentes de Parkinson <i>versus</i> grupo Controlo	19
Tabela 8 - Metabolito que contribui para componente 1, sexo Masculino.....	22
Tabela 9 - Metabolitos que contribuíram para a componente 2, sexo Masculino	23
Tabela 10 - Metabolito que contribui para a componente 3, sexo Masculino	24
Tabela 11 - Metabolito que contribui para a componente 1, sexo Feminino	26
Tabela 12 - Metabolito que contribui para a componente 2, sexo Feminino	26
Tabela 13 - Regiões do espectro de RMN que contribuem para a componente 3, sexo Feminino	27
Tabela 14 - Regiões do espectro de RMN que influenciam a componente 1, subgrupos	29
Tabela 15 - Tabela de Classificação para a Componente 1.	30
Tabela 16 - Regiões do espectro de RMN que influenciam a componente 2, subgrupos	30
Tabela 17 - Tabela de Classificação para a Componente 2.	31
Tabela 18 - Regiões do espectro de RMN que influenciam a componente 3, subgrupos	32
Tabela 19 - Tabela de Classificação para a Componente 3	33
Tabela 20 - Dados da regressão logística, grupo DP <i>versus</i> grupo Controlo	33
Tabela 21 - Dados da regressão logística, referente ao sexo Masculino	34
Tabela 22 - Dados da regressão logística, referente ao sexo Feminino	35
Tabela 23 - Dados da regressão logística, subgrupos do grupo de doentes de Parkinson e o grupo Controlo	36
Tabela 24 - Tabela de classificação do modelo ordinal.....	36
Tabela 25 - Metabolitos identificados nas amostras de saliva	70

Lista de Acrónimos

DP - doença de Parkinson

SNi - *substantia nigra*

LCR - líquido cefalorraquidiano

RMN - Ressonância Magnética Nuclear

CHCB - Centro Hospitalar Cova da Beira

NICE - *National Institute for Health and Care Excellence*

UKPDSBBC - *United Kingdom Parkinson's Disease Society Brain Bank criteria*

EH&Ym - Escala *Hoehn e Yahr* modificada

AVC - acidente vascular cerebral

L-DOPA - levodopa

MPTP - 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina

COMT - catecol-O-metil transferase

NMDA - N-metil-D-aspartato

TFGe - taxa de filtração glomerular estimada

CKD-EPI - *Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration*

AINES - anti-inflamatórios não esteroides

AAS - ácido acetilsalicílico

CICS-UBI - Centro de Investigação em Ciências da Saúde da Universidade da Beira Interior

TSP - sódio 3-trimetilsilil [2,2,3,3-2H₄] proprionato

JRES - *J-resolved*

HMDB - *The Human Metabolome DataBase*

IC - Intervalos de Confiança

AEM - Análise Estatística Multivariada

sPLS-DA - *sparse Partial Least Squares Discriminant Analysis*

ROC - *Receiver Operating Characteristic*

HTA - hipertensão arterial

DM 2 - Diabetes Mellitus tipo 2

HPLC - high performance liquid chromatography

1. Introdução

Em 1817, James Parkinson, descreve pela primeira vez a Doença de Parkinson (DP) como “Paralisia Agitante” (1), sendo atualmente a segunda doença neurodegenerativa mais frequente (2).

Esta doença caracteriza-se pela degeneração lenta e progressiva dos neurónios dopaminérgicos, levando a uma depleção de dopamina na região alvo das projeções destes neurónios, o estriado, e resultando na disrupção das conexões para o tálamo e córtex motor (3). Vários estudos mostraram que o número de neurónios pigmentados da *substantia nigra* (SNi) estava reduzido em 60% e os neurónios não pigmentados tinham um decréscimo de 26% (4).

A causa da DP não está ainda esclarecida, mas vários trabalhos têm elucidado acerca dos mecanismos subjacentes à neurodegeneração (5). Está demonstrado que o seu processo fisiopatológico se deve à morte celular programada (apoptose) e necrose (6-8), que parecem ser consequência de uma cascata de eventos dos quais se destacam a agregação de α -sinucleína, disfunção mitocondrial, stress oxidativo e mecanismos inflamatórios (3).

Alguns estudos sugerem que ocorre a destruição de neurónios não dopaminérgicos antes das alterações na SNi (9), progredindo num sentido caudal-rostral e atingindo o mesencéfalo apenas depois do envolvimento extenso do tronco cerebral, com o envolvimento do sistema nervoso autónomo também nessa fase (10). Isto evidencia que a fisiopatologia dos sintomas não motores precede temporalmente a dos sintomas motores clássicos (9).

Assim, a divisão clínica da história natural da doença pode-se fazer em duas fases (Figura 1): Pré-Clínica, caracterizada por uma sinucleinopatia, sem sintomas clínicos, e que poderá ser definida por biomarcadores atualmente indisponíveis; Clínica, que com a presença dos sintomas motores clássicos permite diagnosticar a DP (11).

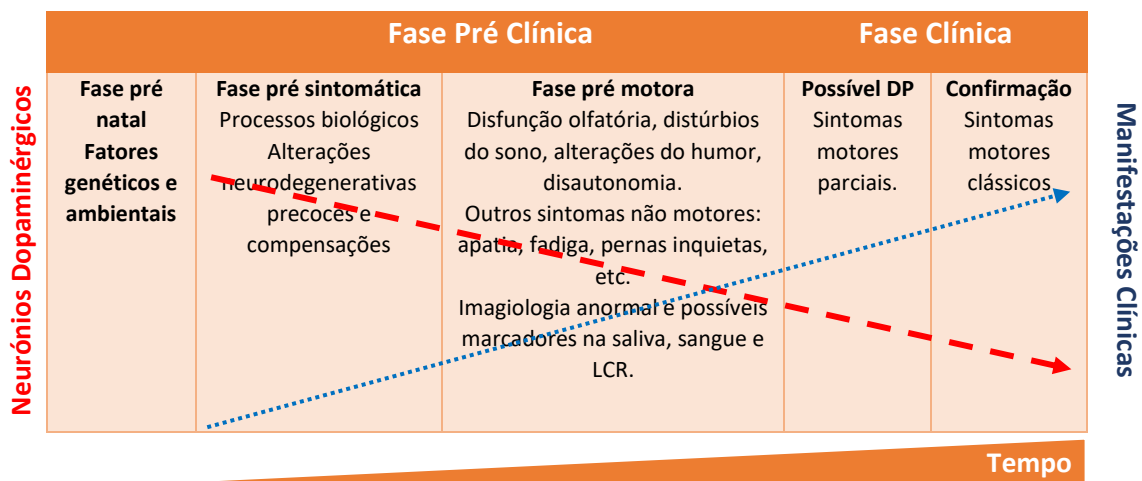


Figura 1 - Proposta de evolução da doença de Parkinson. A progressão característica da DP envolve a perda de neurónios dopaminérgicos, com progressão lenta e gradual ao longo de anos (Fase Pré-Clínica). Antes do aparecimento dos sintomas clássicos da DP, vários sintomas não motores estão presentes (Fase Pré-Motora). Esta fase poderá ser um bom “alvo” para a investigação de marcadores biológicos para a DP. Os sintomas pré-motores podem persistir na fase motora. LCR: líquido cefalorraquidiano. Imagem adaptada de (11).

Diversos estudos promissores propõem biomarcadores para a fase pré-diagnóstico da DP, a fase Pré-Clínica (12). Nesta, tratamentos modificadores do desenvolvimento da DP, tais como terapias com agentes neuroprotetores, poderiam atrasar ou suspender o processo de degeneração dos neurónios dopaminérgicos.

Diversos estudos do perfil metabólico de doentes de Parkinson têm sido desenvolvidos numa tentativa de compreender a sua etiologia, fisiopatologia e propor possíveis biomarcadores para o diagnóstico desta doença. Desses estudos alguns utilizaram plasma (13), outros urina (14) e líquido cefalorraquidiano (LCR) (15), tendo sido identificados metabolitos que permitiram distinguir os doentes de Parkinson de indivíduos saudáveis. Apesar dos resultados favoráveis, os fluídos utilizados ou eram recolhidos por métodos invasivos, nomeadamente o sangue e LCR, ou requerem uma disponibilidade do indivíduo para a colheita de urina, o que poderá diminuir a adesão causando prejuízo para a saúde do indivíduo.

A saliva apresenta um enorme potencial para investigação de biomarcadores. Além de ser colhida sem recurso a métodos invasivos, é composta por uma complexa mistura de fluídos com diversas funções, resultando da secreção exócrina de diversas glândulas (16) controladas pelo sistema nervoso autónomo. Além disso, na DP verifica-se um aumento da salivagem devido a vários mecanismos designadamente, aumento da velocidade de excreção (17), défice na deglutição (18) e dificuldade de retenção de saliva (19).

Alguns estudos apontaram um possível envolvimento da saliva e das glândulas salivares na fisiopatologia da DP. A análise da saliva de doentes de Parkinson demonstrou o aumento da quantidade total de algumas proteínas, nomeadamente a DJ-1 (20), uma enzima neuronal com papel antioxidante, e uma diminuição de α -sinucleína (21). Amostras de biópsias das glândulas submandibulares de doentes de Parkinson demonstraram a existência de α -sinucleína do tipo de Lewy (22).

Existem diversas ferramentas diagnósticas para a pesquisa de biomarcadores. A Ressonância Magnética Nuclear (RMN) é uma técnica que permite a análise de fluídos biológicos e tem sido utilizada na análise dos metabolitos aí presentes (metabólica). Assim, tem-se tornado uma ferramenta muito útil na pesquisa de biomarcadores metabólicos de doenças. Comparativamente a outras técnicas, nomeadamente a espectrometria de massa, a RMN destaca-se pelo manuseamento mínimo da amostra, fácil análise quantitativa, robustez, versatilidade e reprodutibilidade (23). A RMN tem sido aplicada no estudo do perfil metabólico da saliva em várias doenças, nomeadamente sarcoidose (24), Diabetes *Mellitus* tipo 1 (25) e Doença de Alzheimer (26), permitindo um diagnóstico mais eficaz.

Assim, o objetivo do presente trabalho foi analisar, por RMN, o perfil metabólico da saliva de doentes de Parkinson e determinar a sua utilidade na discriminação destes doentes, relativamente a indivíduos controlo, podendo auxiliar no diagnóstico precoce da DP.

2. Material e Métodos

2.1. Aprovação Ética

O protocolo de investigação foi aprovado pela Comissão de Ética do Centro Hospitalar Cova da Beira (CHCB) (Anexo 1). Todos os indivíduos participantes no estudo deram consentimento livre e informado por escrito (Anexo 2).

2.2. Seleção dos indivíduos para estudo

O estudo foi conduzido com 25 doentes de Parkinson, 14 do sexo masculino e 11 do sexo feminino, com idades compreendidas entre 55 e 86 anos. Para o grupo Controlo, foram identificados 39 potenciais participantes. Treze desses indivíduos foram excluídos após avaliação clínica e das análises sanguíneas, de acordo com os critérios referidos na secção seguinte. Assim, o estudo incluiu 26 Controlos, 11 do sexo masculino e 15 do sexo feminino, com idades compreendidas entre 59 e 86 anos.

2.2.1. Seleção dos doentes de Parkinson

Foram incluídos os doentes com diagnóstico de DP observados na consulta externa de Neurologia no CHCB entre janeiro de 2013 e dezembro de 2016.

Atualmente, o diagnóstico da DP é possível através de critérios estritamente clínicos que incluem os sinais cardinais da DP, o tremor, a bradicinesia, a rigidez e a instabilidade postural, sendo que este último, habitualmente, se manifesta numa fase mais tardia da doença (27-30).

As *guidelines* atuais do *National Institute for Health and Care Excellence* (NICE) recomendam os Critérios do *United Kingdom Parkinson's Disease Society Brain Bank* (UKPDSBBC) (28), pelo que foram esses os utilizados no presente estudo, Tabela 1(4). Para cada doente de Parkinson foi efetuado o estadiamento da doença, utilizando-se a Escala *Hoehn e Yahr* modificada (EH&Ym) apresentado na Tabela 2 (31).

Tabela 1 - Critérios do *United Kingdom Parkinson's Disease Society Brain Bank*, adaptado de (28).

<p>Passo 1 - Diagnóstico da Síndrome Parkinsónica</p> <ul style="list-style-type: none">• Bradicinesia• Pelo menos um dos seguintes sintomas:<ul style="list-style-type: none">– Rigidez muscular– Tremor de repouso de 4-6 Hertz– Instabilidade postural não causada por disfunção primária visual, vestibular, cerebelar ou proprioceptiva
<p>Passo 2 - Critérios de exclusão para a doença de Parkinson</p> <p>História de:</p> <ul style="list-style-type: none">• acidentes vasculares cerebrais (AVC) repetidos com progressão gradual para parkinsonismo• lesões repetidas da cabeça• encefalite definida• crises oculogíricas• tratamento com neurolépticos na altura de desenvolvimento dos sintomas• mais do que um familiar com doença de Parkinson• remissão sustentada• características estritamente unilaterais após 3 anos• paralisia do olhar supranuclear• sinais cerebelares• envolvimento do sistema autónomo severo precoce• demência precoce grave com distúrbio da memória, da linguagem e da praxia• sinal de Babinski• presença tumor cerebral ou hidrocefalia de comunicação em estudo de imagem• resposta negativa a grandes doses de levodopa (L-DOPA) na ausência de má absorção• exposição a 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP)
<p>Passo 3 - Critérios prospetivos positivos de suporte para a doença de Parkinson</p> <p>Em combinação com o Passo 1, três ou mais dos seguintes pontos são necessários para o diagnóstico definitivo da doença de Parkinson:</p> <ul style="list-style-type: none">• início unilateral• presença de tremor em repouso• doença progressiva• assimetria persistente, com maior afeção do lado de onde se inicia• resposta excelente à L-DOPA (70-100%)• coreia severa induzida pela L-DOPA• resposta à L-DOPA por mais de 5 anos• curso clínico com 10 ou mais anos

Tabela 2 - Escala *Hoehn e Yahr* modificada, adaptado de (31).

Estádio Sintomas	
1,0:	Somente envolvimento unilateral
1,5:	Envolvimento unilateral e axial
2,0:	Envolvimento bilateral sem prejuízo do equilíbrio
2,5:	Doença bilateral leve com recuperação no <i>Pull test</i>
3,0:	Doença bilateral leve a moderada; alguma instabilidade postural; fisicamente independente
4,0:	Incapacidade grave; sendo capaz de andar e ficar em pé sem ajuda
5,0:	Necessita de cadeira de rodas para se movimentar ou está acamado

A todos os indivíduos foi aplicado um questionário (Anexo 3), consultado o processo clínico, efetuado exame neurológico pelo médico especialista em Neurologia, análises laboratoriais e recolha de saliva. O Neurologista observou cada indivíduo, realizando exame neurológico, o que permitiu a aplicação da EH&Ym, e avaliou os sinais cardinais da DP. A entrevista e avaliação do historial clínico permitiu adquirir informação demográfica e médica, nomeadamente a duração a DP, sintomas motores inaugurais, presença ou ausência de sintomas não motores, dose média diária de L-DOPA, medicação prévia e atual para a DP, resultados de exames imagiológicos cerebrais, comorbidades, outras medicações e episódios de urgência.

Para todos os indivíduos foi criado um código do estudo, tal como para todos os respetivos documentos, de forma a manter a confidencialidade.

2.2.2. Seleção dos Controlos

O grupo Controlo foi recrutado a partir das listas de consulta externa de Urologia e Uroginecologia, no período de janeiro de 2013 a fevereiro de 2017. A escolha destas consultas em particular para seleção de indivíduos para o grupo de controlos, deve-se ao facto de já existir um protocolo previamente realizado com o CHCB. Isto porque os doentes habitualmente seguidos nessas consultas apresentarem menor número de patologias e medicação passíveis de exclusão no nosso estudo. Para a sua seleção, de forma a assegurar a exclusão de parkinsonismo, foram utilizados os critérios de exclusão presentes no UKPDSBBC (4).

Foram ainda excluídos os indivíduos que usavam as seguintes medicações: inibidores da síntese de urato, agonistas dos recetores ativados por proliferador de peroxissoma, (glitazonas), inibidores da recaptção da serotonina-noradrenalina, antipsicóticos, agonistas e antagonistas da dopamina, inibidores da catecol-O-metil transferase (COMT), inibidores da monoamina oxidase (MAO), inibidores dos recetores N-metil-D-aspartato (NMDA), agonistas e antagonistas da acetilcolina. Foram também excluídos fumadores ativos e indivíduos com história pessoal de doenças neurodegenerativas ou acidente vascular cerebral (AVC).

Aqueles que apresentavam taxa de filtração glomerular estimada (TFGe) <45 mL/min/1,73m² durante mais de um ano foram também excluídos; a TFGe foi calculada a partir da equação da *Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration* (CKD-EPI) (32).

A cada indivíduo foi aplicado um questionário (Anexo 3), consultado o processo clínico, efetuado exame neurológico, análises laboratoriais e recolha de saliva. A entrevista e avaliação do historial clínico permitiu adquirir informação demográfica e médica, nomeadamente comorbidades, medicações e episódios de urgência.

A todos os indivíduos foi atribuído um código do estudo, tal como a todos os respetivos documentos, de forma a manter a confidencialidade.

2.2.3. Outros critérios de exclusão

Também foram critérios de exclusão para os grupos de doentes de Parkinson e Controlo os seguintes:

- doenças inflamatórias e imunológicas crónicas;
- doenças infecciosas agudas ou crónicas;
- insuficiência hepática;
- dependência de álcool;
- enfarte do miocárdio e cirurgia nos últimos 6 meses;
- tratamento atual com:
 - ✓ fármacos anti-inflamatórios não esteroides (AINES), exceto ácido acetilsalicílico em dose antiagregante (≤ 150 mg/dia);
 - ✓ glucocorticóides, exceto inaláveis cuja biodisponibilidade sistémica é menor que 2%;
 - ✓ imunossuppressores;
 - ✓ terapia hormonal de substituição (exceto não esteroide);
 - ✓ antibióticos e citostáticos.

2.3. Colheita e preparação da amostra de saliva

Os doentes de Parkinson e Controlos foram submetidos a colheita de saliva não estimulada. As amostras foram colhidas à temperatura ambiente. Os indivíduos encontravam-se sem comer, beber, lavar a cavidade oral e fumar pelo período mínimo de duas horas, para que não existisse interferência de agentes exógenos na composição da saliva.

Para a colheita de saliva foi utilizado um tubo de colheita do kit *SalivaBio Passive Drool Method*[®], da *Salimetrics*[®], com cada amostra medindo em média 2 mL. As amostras de saliva foram recolhidas para um tubo contendo uma solução de fluoreto de sódio (NaF), numa concentração final de $0,4 \text{ mol/dm}^3$. A utilização do NaF permite que a amostra se mantenha íntegra, na medida em que este possui atividade antimicrobiana (33).

Após a colheita, a saliva foi armazenada e transportada em gelo até ao laboratório do Centro de Investigação em Ciências da Saúde da Universidade da Beira Interior (CICS-UBI).

As amostras foram posteriormente homogeneizadas e divididas em duas alíquotas de 1 mL cada. Em seguida foram centrifugadas à temperatura de $4 \text{ }^\circ\text{C}$, a $15000 \times g$ durante 30 minutos, de forma a separar o sobrenadante das células e detritos celulares (33). Procedeu-se à recolha do sobrenadante que foi posteriormente armazenado a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$, permitindo manter a estabilidade dos metabolitos presentes na saliva até à data da análise.

No dia da análise, as amostras foram preparadas retirando-se $400 \text{ } \mu\text{L}$ da alíquota de saliva, previamente descongelada em gelo, para um novo tubo *eppendorf* e adicionando-se 400

μL de solução tampão¹. A solução tampão contém um composto para referência interna (0 ppm no espectro de RMN de ^1H) designado sódio 3-trimetilsilil [2,2,3,3- $^2\text{H}_4$] proprionato (TSP). Após diluição do tampão para metade, aquando da preparação da amostra de saliva para análise (400 μL saliva + 400 μL tampão), as concentrações dos constituintes do tampão passam para metade. Este tampão permite ainda a estabilização do pH da amostra. Em seguida, realizou-se uma centrifugação à temperatura de 4 °C, a 15000 $\times g$ durante 20 minutos, após a qual se retiraram 700 μL do sobrenadante para novo tubo *ependorf*. Posteriormente, homogeneizou-se e transferiram-se 600 μL para um tubo de RMN de 5 mm.

2.4. Espectros de RMN ^1H e identificação de metabolitos

A aquisição dos espectros de RMN das amostras de saliva foi realizada à temperatura de 301,0 K, num espectrómetro Bruker® Avance III 600MHz, equipado com uma crio-sonda. Para o controlo do espectrómetro, assim como para a análise e processamento dos espectros, foi utilizado o programa TOPSPIN, versão 3.1 (*Bruker Biospin*®, Fallanden, Suíça).

2.4.1. Espectros RMN de ^1H unidimensionais

Para a aquisição dos espectros RMN de ^1H unidimensionais das amostras de saliva foi utilizada a sequência de pulsos *noesygprr1d* e os seguintes parâmetros: largura de pulso de 90° (*P1*) entre 13,250 e 14,330 μs , determinada automaticamente pelo software, largura da janela de aquisição (*SW*) de 20 ppm; *time domain* (*TD*) de 98304 pontos; tempo de relaxação (*D1*) de 10,0 segundos; número de transientes (*NS*) 64; *dummy scans* (*DS*) 4; ganho do recetor (*RG*) 80,6; temperatura 301,0 K. O valor de *LB* (*line broadening*) usado no processamento destes espectros foi de 0,30 Hz.

2.4.2. Espectros RMN bidimensionais - *J-resolved*

Para a aquisição dos espectros RMN bidimensionais resolvidos em *J* (*J-resolved*, sendo *J* a constante de acoplamento) das amostras de saliva foi utilizada a sequência de pulsos *jresgpprrqf* e os seguintes parâmetros: largura de pulso de 90° (*P1*) semelhante à utilizada no espectro de RMN de ^1H unidimensional da respetiva amostra de saliva, largura da janela de aquisição (*SW*) de 16,7 ppm (*F2*) e 0,13 ppm (*F1*); *time domain* (*TD*) de 8192 pontos (*F2*) e 40 pontos (*F1*); tempo de relaxação (*D1*) de 5,0 segundos; número de transientes (*NS*) 2; *dummy scans* (*DS*) 16; ganho do recetor (*RG*) 80,6; temperatura 301,0 K. O valor de *LB* (*line broadening*) usado no processamento destes espectros foi de 1,0 Hz (*F2*) e 0,30 Hz (*F1*).

¹ 0,07498 mol/dm³ NaH₂PO₄, 0,008 mol/dm³ NaF, 0,004 mol/dm³ TSP em 80% H₂O e 20% D₂O, pH 7,4 \pm 0,2.

2.4.3. Testes de estabilidade e reprodutibilidade

Os testes de estabilidade da amostra de saliva foram realizados pela reprodução dos procedimentos descritos nas secções 2.3, 2.4.1 e 2.4.2. No processo de aquisição dos espectros de RMN, foi utilizada a mesma amostra de saliva que, após descongelação, se encontrava à temperatura ambiente entre aquisições. Os espectros de RMN foram adquiridos a cada 40 min, até um total de 72 horas, tendo sido posteriormente analisados para identificar possíveis alterações decorrentes na amostra de saliva.

Os testes de reprodutibilidade foram realizados por duas pessoas diferentes, replicando-se o mesmo processo descrito na secção 2.3, seguindo-se a aquisição dos espectros como descrito nas secções 2.4.1 e 2.4.2. Os espectros de RMN foram depois analisados para identificação de possíveis alterações.

2.4.4. Identificação dos metabolitos

A atribuição dos sinais nos espectros de RMN de ^1H , levando à identificação dos metabolitos presentes nas amostras de saliva, foi realizada através do programa TOPSPIN, versão 3.1 (*Bruker Biospin*[®], Fallanden, Suíça), através das análises dos espectros uni- e bidimensionais, com o auxílio da base de dados *The Human Metabolome DataBase (HMDB)* (34-36). Esta permitiu a identificação dos metabolitos através dos seus desvios químicos (ressonâncias) representados nos espectros de RMN e a multiplicidades dos sinais.

Em certos casos não foi possível identificar os metabolitos presentes nos espectros de RMN de ^1H unidimensionais, havendo necessidade de, no futuro, se fazer um estudo complementar adquirindo um conjunto de espectros de RMN bidimensionais para atribuição das ressonâncias em falta e, se necessário, através de espectrometria de massa.

2.5. Análise estatística

2.5.1. Divisão em subgrupos

Para uma melhor análise da progressão da DP consoante os estádios da EH&Ym e pelo facto de a amostra populacional ser pequena, foram designados os seguintes subgrupos:

- Subgrupo I: estádios da EH&Ym 1 e 1,5
- Subgrupo II: estádios da EH&Ym 2 e 2,5
- Subgrupo III: estádios EH&Ym 3, 4 e 5

2.5.2. Estatística descritiva e inferencial

A análise estatística das características da amostra do nosso estudo, grupos doentes de Parkinson e Controlo, foi realizada utilizando o programa *SPSS*[®] versão 24.

Os dados são apresentados como médias \pm desvio padrão para medidas contínuas, percentagens e contagens para as variáveis categóricas.

A avaliação da normalidade foi efetuada através do teste de *Shapiro-Wilk*. As diferenças nas variáveis estudadas entre os grupos de doentes de Parkinson e Controlo foram avaliadas por

análise de variância, teste *t-Student* para amostras independentes ou, alternativamente, com o teste *U* de *Mann-Whitney*. A associação entre as variáveis categóricas foi avaliada com o teste exato de *Fisher*, quando o primeiro não se mostrou adequado.

Um valor de *p* inferior a 0,05 foi considerado como estatisticamente significativo e os Intervalos de Confiança (IC) foram considerados a 95%.

2.5.3. Análise Estatística Multivariada

Após aquisição e processamento, os espectros de RMN foram analisados por Análise Estatística Multivariada (AEM) para identificar características espectrais distintas, entre os espectros de RMN de saliva de doentes de Parkinson e de indivíduos do grupo Controlo, capazes de permitir a discriminação entre estes dois grupos.

A AEM foi efetuada da seguinte forma (37):

- 1) Pré-processamento estatístico: Recolha e tratamento dos dados de RMN para os levar a uma forma adequada para AEM;
- 2) *Bucketing* (dados reduzidos a uma matriz), normalizando e dimensionando a matriz, sendo que o programa utilizado foi o programa *AMIX (Bruker)*, versão 3.9.7, respeitante à área que os metabolitos ocupam no espectro;
- 3) Executando a AEM real: múltiplos métodos não supervisionados e supervisionados estão disponíveis.

Há uma vasta gama de métodos de AEM e múltiplas plataformas de programas disponíveis para executar cada etapa desta análise (38). Na nossa AEM, foi utilizado o pacote *mixOmics* (www.mixomics.org) para o programa R (*The R Project for Statistical Computing, The R Foundation*®), versão 3.3.2, com a interface *RStudio*®, versão 1.0.136.

Embora a regressão pelo método dos mínimos quadrados parciais (*Projections on Latent Structures*, PLS, vulgarmente conhecida por *Partial Least Squares*) não tenha sido inicialmente concebida para problemas de classificação e discriminação, tem sido frequentemente utilizado para esse fim. A matriz de resposta, *Y*, é categórica (grupo de doentes de Parkinson e grupo Controlo ou subgrupos do grupo de doentes de Parkinson e grupo Controlo) e é internamente recodificada como uma matriz de bloco fictício que regista a associação de cada observação, isto é, cada uma das categorias de resposta é codificada através de uma variável de indicador (*dummy variable*). A regressão PLS [agora *PLS-Discriminant Analysis (PLS-DA)*] é então executada como se *Y* fosse uma variável contínua (38).

A PLS-DA é um modelo linear que reduz os dados em componentes (variáveis latentes), realiza uma tarefa de classificação e é capaz de prever a classe de novas amostras (38)

Para a análise de dados foi utilizada uma versão particular da PLS-DA, a *sparse Partial Least Squares Discriminant Analysis (sPLS-DA)* que permite, além da redução dos dados em componentes (variáveis latentes) que maximizam a covariância com a variável resposta *Y*, a seleção das características (variáveis/metabolitos) mais preditivas ou discriminatórias nos dados que auxiliam na classificação das amostras (38). O número ótimo de variáveis latentes (componentes) a extrair e o número ótimo de variáveis do espectro que melhor definem cada

componente foram determinados por validação cruzada com o método *leave-one-out*. Adicionalmente, foi realizada uma análise ROC (*Receiver Operating Characteristic*) com o objetivo de se obter o poder discriminante das componentes extraídas.

2.5.3.1. Análises discriminativas entre grupos

Na análise *sPLS-DA* foram realizadas quatro tipos de análises discriminativas:

1. Discriminação entre o grupo de doentes de Parkinson e grupo Controlo;
2. Discriminação entre o grupo de doentes de Parkinson e grupo Controlo, referente ao sexo masculino;
3. Discriminação entre o grupo de doentes de Parkinson e grupo Controlo, referente ao sexo feminino;
4. Discriminação entre os 3 subgrupos atribuídos (referidos acima) do grupo de doentes de Parkinson e o grupo Controlo.

2.5.4. Regressão logística complementar

Como complemento à *sPLS-DA*, foram criados modelos de regressão logística com os metabolitos mais relevantes das componentes extraídas que tiveram de sofrer previamente uma transformação pela divisão por 1 milhão de unidades, pelo facto de a ordem de grandeza dos valores dos metabolitos ser na ordem dos milhões.

Adicionalmente, foi obtido um modelo de regressão logística ordinal usando-se como preditor o único metabolito que mostrou ter poder de discriminação para os subgrupos da DP. Utilizou-se a função de ligação *Cauchitz*, visto que esta foi a que permitiu um melhor ajuste do modelo aos dados. A forma da distribuição dos subgrupos sugeria³ a utilização da função de ligação log-log negativo⁴. Contudo, o teste das linhas paralelas⁵, mostrou-se significativo e, conseqüentemente, não seria adequada a utilização dessa função de ligação. Com o modelo logístico obtido estimaram-se os valores de corte do metabolito usado, que permitem discriminar os indivíduos nos três subgrupos da DP e os Controlo.

Foram incluídos nos modelos logísticos todos os metabolitos cujo valor de *p* no teste de *Wald* não ultrapassou o valor 0,2, já que, devido à dimensão reduzida da amostra, o critério com o nível de significância 0,05 excluiria metabolitos com interesse preditivo.

² inversa da função de distribuição de *Cauchy*

³ frequências mais altas em subgrupos inferiores

⁴ inversa da função de distribuição de *Gumbel*

⁵ testa se um coeficiente de regressão é o mesmo para todas as categorias da variável dependente

3. Resultados

Estudámos as características da nossa amostra e, posteriormente, efetuámos a identificação dos padrões de metabolitos das amostras de saliva e respetiva análise estatística no sentido de detetar diferenças que permitam a distinção entre os diferentes grupos e subgrupos descritos na secção anterior.

3.1. Características demográficas da amostra em estudo

O grupo de doentes de Parkinson era constituído por 25 indivíduos, maioritariamente do sexo masculino (56,0%), com idade média de $75,0 \pm 6,9$ anos (Tabela 3).

No grupo Controlo, composto por 26 indivíduos, a distribuição de género era semelhante, mas a média de idades era menor ($69 \pm 7,2$ anos; $p = 0,040$) (Tabela 3).

Verificou-se que a média das idades dos indivíduos do sexo masculino nos dois grupos não era significativamente diferente ($p = 0,104$). Contudo, o mesmo não se verificou para o sexo feminino ($p = 0,018$), sendo a média significativamente maior para o grupo de doentes de Parkinson (Tabela 3).

No que diz respeito às comorbilidades, as mais prevalentes no grupo de doentes de Parkinson foram a doença psiquiátrica (56,0 %) e a hipertensão arterial (HTA) (56,0 %), seguindo-se as doenças musculoesqueléticas (40,0 %). Já no grupo Controlo, a doença metabólica (69,2 %, que inclui alterações hormonais da tiroide, dislipidemia e hiperuricemia) foi a comorbilidade mais frequente, seguida da HTA (61,5 %) e das doenças musculoesqueléticas (61,5 %). A destacar que os indivíduos com as patologias englobadas na categoria “doenças metabólicas” estavam medicados e controlados (Tabela 3).

Verificámos que os 2 grupos apresentam comorbilidades semelhantes, exceto para 3 grupos de patologias: o grupo Controlo apresenta maior número de indivíduos com doenças metabólicas (69,2 % no grupo Controlo, face a 36,0% no grupo de doentes de Parkinson, $p = 0,025$); já o grupo de doentes de Parkinson incluiu um maior número de indivíduos com doença renal crónica em estágio 3 (32,0%, face a 3,8% no grupo Controlo, $p = 0,011$), isto porque os critérios de exclusão foram mais permissivos para este grupo, e um maior número de indivíduos com doença psiquiátrica (56,0%, face a 15,4% no grupo Controlo, $p = 0,003$), que é compatível com o facto de esta fazer parte do espectro da DP (Tabela 3).

Tabela 3 - Descrição demográfica da população em estudo: grupos de doentes de Parkinson e Controlo. A doença metabólica inclui alterações hormonais da tiroide, dislipidemia e hiperuricemia. O valor de *p* para cada linha da tabela, refere-se à comparação entre o grupo de doentes de Parkinson e o grupo Controlo. ^aTeste exato de Fisher ^bTeste *t*-Student

		Grupo doentes de Parkinson (n = 25)	Grupo Controlo (n = 26)	Valor <i>p</i>
Género	Masculino	14 (56,0 %)	11 (42,3 %)	0,579 ^a
	Feminino	11 (44,0 %)	15 (57,7 %)	
Idade (anos) [média ± desvio padrão]	Total	75,0 ± 6,9	69,0 ± 7,2	0,004^b
	Masculino	73,9 ± 7,4	69,0 ± 6,9	0,104 ^b
	Feminino	76,4 ± 6,4	69,1 ± 7,7	0,018^b
Comorbilidades	Doença Psiquiátrica	14 (56,0 %)	4 (15,4 %)	0,003^a
	Hipertensão Arterial	14 (56,0 %)	16 (61,5 %)	0,779 ^a
	Doença Musculoesquelética	10 (40,0 %)	16 (61,5 %)	0,165 ^a
	Doença Metabólica	9 (36,0 %)	18 (69,2 %)	0,025^a
	Doença Cardiovascular	8 (32,0 %)	8 (30,8 %)	1,000 ^a
	Doença Renal Crónica, estágio 3	8 (32,0 %)	1 (3,8 %)	0,011^a
	Diabetes Mellitus tipo 2	7 (28,0 %)	4 (15,4 %)	0,324 ^a
	Doença Aparelho Respiratório	6 (24,0 %)	4 (15,4 %)	0,449 ^a
	Doença Urológica	5 (20,0 %)	10 (38,5 %)	0,220 ^a
	Síndrome Vertiginoso	2 (8,0 %)	0	0,110 ^a
	Doença Gastrointestinal	2 (8,0 %)	3 (11,5 %)	1,000 ^a
	Doença Cerebrovascular	2 (8,0 %)	1 (3,8 %)	0,610 ^a
	Outras doenças neurológicas não degenerativas	2 (8,0 %)	1 (3,7 %)	0,610 ^a

3.1.1. Grupo de doentes de Parkinson

Dentro do grupo dos doentes de Parkinson apenas um indivíduo apresentava história familiar da doença, definida como ter pelo menos um familiar direto com DP (Tabela 4).

A DP manifestou-se, em média, pelos 68,2 ± 8,0 anos de idade. O sintoma inaugural mais frequente foi o tremor (88 %), seguido por ordem decrescente pela rigidez (16 %), bradicinesia (12 %) e parestesias (4 %) (Tabela 4).

À data da avaliação, o sintoma mais frequente era a rigidez (88 %), seguida pelo tremor (60 %) e bradicinesia (52 %). Apenas um doente apresentava instabilidade postural e outro apresentava um quadro acinético-rígido (Tabela 4). Dos sintomas não motores, as alterações de humor (68 %), as alterações do sono (48 %) e a obstipação (36 %) foram os mais prevalentes (Tabela 4).

Quanto à classificação da doença através da EH&Ym, a amostra é mais representativa dos estádios iniciais, sendo que 52 % dos doentes de Parkinson apresentavam a doença nos dois estádios iniciais (Tabela 4).

Quanto à terapêutica dirigida à DP, todos os doentes estavam medicados com pelo menos um fármaco. A grande maioria dos doentes estava medicada com levodopa (92 %), em

média desde há 4,0 ± anos. A dose média diária de levodopa entre os doentes de Parkinson foi de 541,3 ± 337,7 mg, com mínimo de 50 mg diários e máximo de 1500 mg diários. O segundo fármaco mais frequente nesta amostra foram os agonistas da dopamina (60 %), seguidos pelos inibidores da catecol-O-metil transferase (COMT, 28 %) e pelos inibidores irreversíveis da monoamina oxidase B (Rasagilina, 20 %) (Tabela 4).

Tabela 4 - Caracterização do grupo de doentes de Parkinson. Selegilina (IMAO-B: inibidor seletivo e irreversível da monoamina oxidase B) e Amantadina (antagonista recetores NMDA, aumenta a libertação de dopamina e inibe o recaptção de dopamina).

		Número de indivíduos (% de indivíduos)		
História familiar		1 (4)		
Idade de início dos sintomas (anos) (média ± desvio padrão)		68,2 ± 8,0		
Sintomas inaugurais	Tremor	22 (88)		
	Rigidez	4 (16)		
	Bradicinesia	3 (12)		
	Instabilidade postural	0 (0)		
	Outro	1 (4)		
Sintomas motores atuais	Rigidez	22 (88)		
	Tremor	15 (60)		
	Bradicinesia	13 (52)		
	Instabilidade postural	1 (4)		
	Outro	1 (4)		
Sintomas não motores atuais	Alterações de humor	17 (68)		
	Alterações do sono	12 (48)		
	Obstipação	9 (36)		
	Disfunção cognitiva	4 (16)		
	Alterações sensitivas/ álgicas	4 (16)		
	Psicose	1 (4)		
	Outros	4 (16)		
Estádio da EH&Ym	1	9 (36)	I	13 (52)
	1,5	4 (16)		
	2	7 (28)	III	7 (28)
	3	3 (12)		
	4	2 (8)		
Medicação para DP	Levodopa	Doentes sob terapêutica	23 (92)	
		Duração (anos)	4,0 ± 2,2	
		Dose (mg/dia)	541,3 ± 337,7	
	Agonista Dopamina		15 (60)	
	Inibidores da COMT		7 (28)	
	Rasagilina		5 (20)	
	Selegilina		2 (8)	
	Anticolinérgicos		2 (8)	
	Amantadina		1 (4)	

3.2. Espectros RMN de ^1H e identificação de metabolitos

3.2.1. Estabilidade e reprodutibilidade

Foram realizados teste de estabilidade das amostras de saliva, nos quais se verificou que existiam alterações e intensidade dos sinais de RMN de ^1H correspondentes a diferentes metabolitos a partir das 3 horas à temperatura ambiente (Figura 2). Assim, preconizou-se que as amostras de saliva fossem descongeladas e preparadas para a análise no momento imediatamente antes da aquisição de espectros.

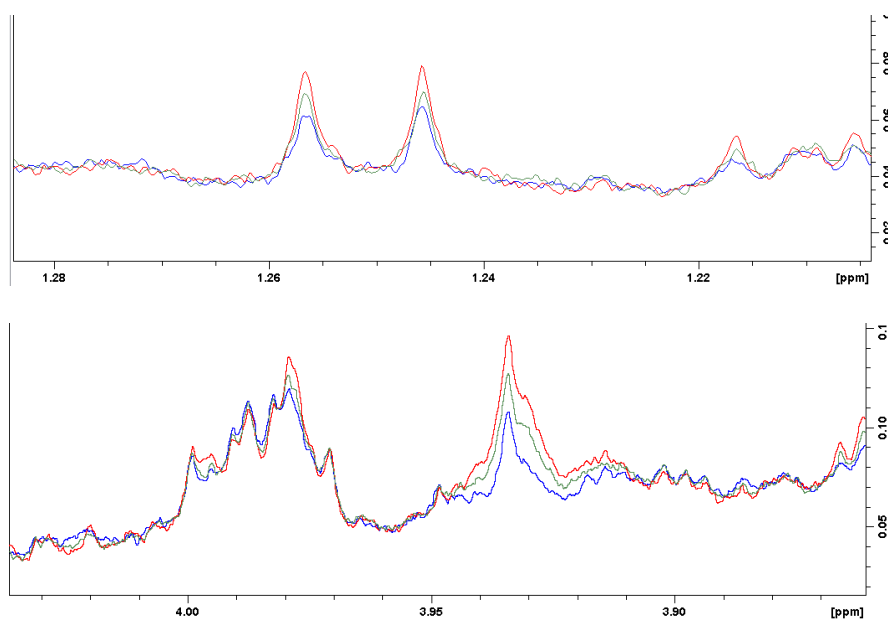


Figura 2 - Espectro de RMN de ^1H unidimensional de uma amostra de saliva controlo, a diferentes tempos de aquisição após descongelação e preparação para análise: a azul tempo zero, a verde 3 horas e a vermelho 9 horas, onde se verifica uma alteração na área de alguns dos sinais de RMN ao longo do tempo.

Os testes de reprodutibilidade mostraram que os procedimentos realizados são reprodutíveis entre investigadores, não havendo diferenças significativas entre os espectros de RMN referentes às amostras de saliva por eles preparadas.

3.2.2. Identificação dos metabolitos

Após aquisição, os espectros de RMN foram analisados de forma a identificar metabolitos presentes nas amostras de saliva, e representados pelos vários sinais de RMN presentes nos espectros. As Figuras 21 e 22 (Anexo 8) mostram um espectro de RMN de ^1H representativo de uma amostra de saliva controlo, onde foram identificados diferentes metabolitos.

As experiências de RMN de ^1H unidimensionais são geralmente rápidas, robustas, fáceis de implementar e ideais para testes de rastreio. São habitualmente utilizadas na pesquisa de metabolitos - biomarcadores. A informação obtida é utilizada para identificação e avaliação global de perfil de metabolitos, o metaboloma, entre diferentes grupos. Contudo, dada a baixa sensibilidade inerente à técnica de RMN, apenas se observam os metabolitos mais abundantes. Para além disso, a sua identificação é, muitas vezes, um desafio porque em algumas regiões

dos espectros RMN de ^1H existe uma grande sobreposição de sinais (Anexo 8 - Figura 20[A], Figuras 21 e 22). Os fluídos biológicos, sendo misturas heterogéneas complexas com centenas de metabolitos, apresentam sobreposição de diversos picos nos seus espectros de RMN, dificultando a sua diferenciação (39).

A resolução e sensibilidade dos espectros de RMN melhoram com o aumento da intensidade do campo magnético e com técnicas de simplificação de espectros, permitindo uma melhor dispersão dos picos (39).

Os espectros obtidos por experiências bidimensionais *J-resolved* (JRES) permitem ultrapassar a limitação dos espectros unidimensionais na identificação de metabolitos, na medida em que há um aumento da resolução e de dispersão dos picos dos metabolitos (Anexo 8 -Figura 20 [B]). No entanto, este tipo de experiências requer um maior tempo de aquisição (39).

3.3. Análise Estatística Multivariada - sPLS-DA

Após a identificação dos metabolitos em amostras de saliva procedeu-se à AEM para identificação dos metabolitos mais relevantes para a discriminação entre o grupo de doentes de Parkinson e Controlo, referente ao género, subgrupos de doentes de Parkinson e grupo Controlo.

Para a realização da AEM entre os grupos anteriormente referidos determinou-se por validação cruzada que o número ótimo de componentes a extrair pela análise sPLS-DA seria de três. Para avaliar a discriminação dos indivíduos dos grupos em estudo, efetuada pelo nosso modelo, foram utilizadas curvas ROC tendo-se determinado, com estas, a sensibilidade e especificidade máximas para cada componente, para assim determinar a viabilidade do nosso modelo.

3.3.1. Análise discriminativa entre o grupo de doentes de Parkinson e o grupo Controlo

O objetivo desta análise foi a discriminação entre o grupo de doentes de Parkinson e Controlo. Assim, recorreu-se à AEM para a criação de um modelo estatístico que permitisse a sua diferenciação através dos metabolitos identificados previamente em saliva.

Determinou-se por validação cruzada que o número ótimo de regiões do espectro que explicam as componentes 1, 2 e 3, são 1, 72 e 1, respetivamente (Tabelas 5,6 e 7).

A variância explicada é definida pelo modo como uma determinada componente (1, 2 ou 3, que é constituída por uma região/regiões do espectro RMN) permite explicar se a nossa amostra de saliva pertence ao grupo de doentes de Parkinson ou Controlo. A variância explicada para as componentes 1, 2 e 3, foi 44,9 %, 6,8 % e 7,1 %, respetivamente, sendo 58,8 % o total de variância explicada pelas três componentes.

Na análise discriminativa dos grupos, pela utilização das componentes 1, 2 e 3, verificou-se que estas explicam 33,0 %, 9,2 % e 5,1 % da variância da variável Y, respetivamente, sendo a variância total explicada de 47,3 %. Como referido anteriormente no *Material e*

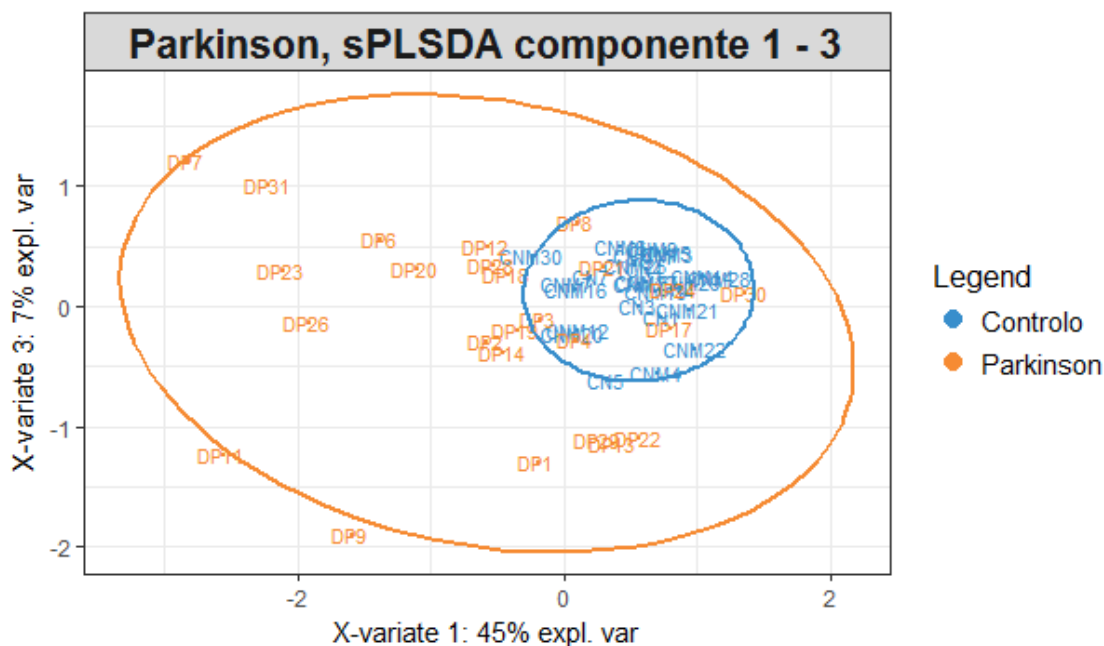


Figura 4 - Análises sPLS-DA pela discriminação cruzada entre as componentes 1 e 3, representando as regiões delimitadas o IC95% para cada grupo, grupo doentes de Parkinson *versus* grupo Controlo

3.3.1.2. Componentes doentes de Parkinson *versus* Controlo: metabolitos e curvas ROC

Componente 1

O único metabolito que definiu a componente 1 encontrava-se na região do espectro de RMN entre 1,18 a 1,22 ppm. Esse metabolito, que identificou-se ser o I Etanol⁶, contribuiu para a discriminação dos dois grupos através da componente 1 e explica 44,9% da amostra (Tabela 5), apresentando um desvio químico de 1,188 ppm (Anexo 8 - Tabela 25 e Figuras 20 e 22), contribuindo para a identificação do grupo de doentes de Parkinson.

Tabela 5 - Metabolito discriminatório da componente 1, com a respetiva região do espectro que permite a discriminação, e coeficiente de regressão para o grupo doentes de Parkinson *versus* grupo Controlo.

^d Para o grupo Controlo o coeficiente de regressão é o simétrico.

Metabolito	Região do espectro (ppm)	Coeficiente de regressão para o grupo de doentes de Parkinson ^d
I Etanol	1,18 - 1,22	0,575

Relativamente à discriminação entre os grupos de doentes de Parkinson e Controlo, efetuada pela componente 1, obteve-se a curva ROC representada na Figura 5, com uma área aproximadamente igual a 0,8385 ($p < 0,001$), que corresponde a uma boa discriminação dos indivíduos (40). A sensibilidade e especificidade máximas, calculadas estatisticamente, foram de 80,0 % e 76,9 %, respetivamente, para o valor de corte de 0,510, em que valores acima desse

⁶ O metabolito Etanol apresenta dois sinais no espectro de RMN ¹H (Tabela 25), sendo que se atribui o nome I Etanol ao primeiro sinal apresentado por este metabolito a partir do valor de 0 ppm, com o desvio químico de 1,188 ppm, e II Etanol ao segundo sinal com o desvio químico 3,732 ppm, realizando-se o mesmo para os metabolitos que apresentem mais do que um sinal no espectro de RMN 1D.

valor de corte predizem que um indivíduo tem DP com uma acurácia de 80,4 %. Na avaliação com a validação cruzada do poder discriminante desta componente obteve-se uma área ROC aproximadamente igual a 0,820, que evidencia uma boa discriminação (40) dos indivíduos pelo I Etanol. De qualquer modo, foi criado um modelo logístico com este metabolito (Tabela 5) e outros, de outras componentes, com o objetivo de evidenciar este poder de discriminação (ver secção 3.4.1 *Resultados*).

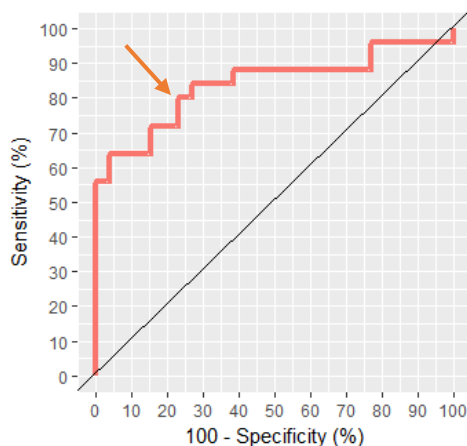


Figura 5 - Curva ROC para a componente 1, mostrando (seta) uma sensibilidade de 80,0% e especificidade de 76,9%, relativa ao grupo de doentes de Parkinson versus grupo Controlo.

Componente 2

A componente 2 explica 6,8% da amostra, sendo definida por 72 regiões do espectro de RMN (Anexo 7 - Figura 19). No entanto, como esta componente explica apenas 6,8% da amostra seleccionámos as primeiras quatro regiões espectrais por terem maior relevância e contributo para esta componente. Apesar disso, entre estas não foi possível a identificação dos metabolitos em determinadas regiões do espectro, que designámos por X_i , $i= 1, 2$ (Figura 6), pelo facto de não estarem descritos na literatura. Só foram possíveis identificar dois metabolito, o Malonato, na região entre 3,14 e 3,18 ppm (Tabela 6), com o desvio químico de 3,155 ppm, e o Lactato na região entre 1,30 e 1,34 ppm, com o desvio químico de 1,32 ppm (Anexo 8- Tabela 25 e Figura 22), tendo ambos contributo para a identificação do grupo de doente de Parkinson.

Tabela 6 - Metabolitos discriminatórios da componente 2, com a respetiva região do espectro que permite a discriminação, e coeficiente de regressão para o grupo doentes de Parkinson versus grupo Controlo.

^d Para o grupo Controlo os coeficientes de regressão são os simétricos.

Metabolitos	Região do espectro (ppm)	Coefficiente de regressão para o grupo de doentes de Parkinson ^d
X_2	3,38 - 3,42	0,038
X_1	3,30 - 3,34	0,039
Lactato	1,30 - 1,34	0,040
Malonato	3,14 - 3,18	-0,048

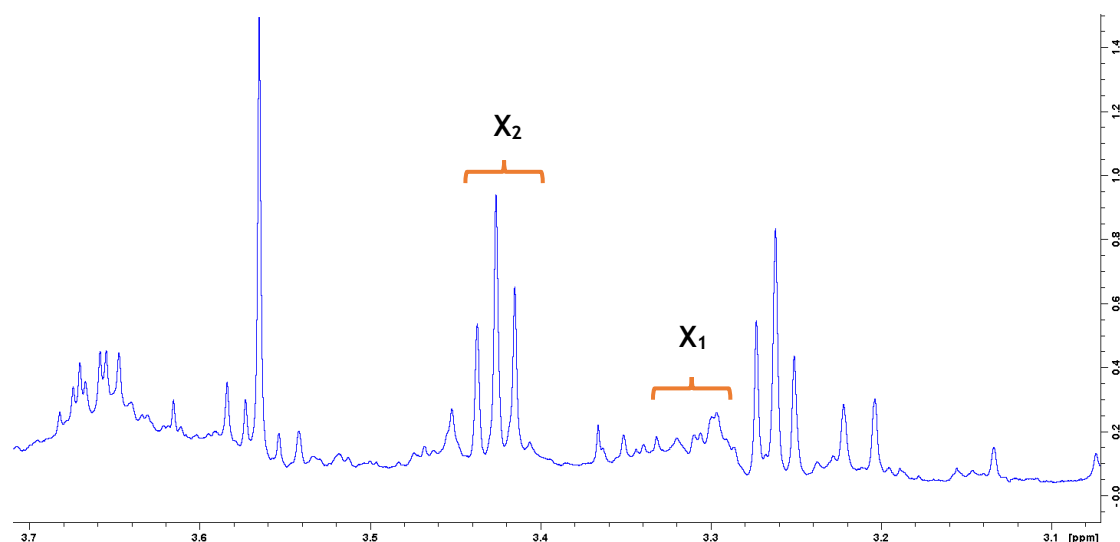


Figura 6 - Espectro de RMN de ^1H , de uma amostra de saliva controle, com os metabolitos não identificados assinalados com X_1 e X_2 .

Relativamente à discriminação entre o grupo de doentes de Parkinson e grupo Controlo efetuada pela componente 2, obteve-se uma curva ROC com uma área de 0,9169 ($p < 0,001$), que corresponde a uma discriminação excecional (40). A sensibilidade e especificidade máximas foram de 88,0 % e 88,5 %, respetivamente, para o valor de corte de 0,529, com uma acurácia de 88,2 %. No entanto, na avaliação do poder de discriminação desta componente após validação cruzada, obteve-se uma área ROC somente de 0,7108, correspondendo a uma discriminação aceitável (40). Pelo fato de haver uma diminuição significativa na área da curva ROC, reavaliou-se o poder de discriminação dos metabolitos, recorrendo-se a um modelo de regressão logística (ver secção 3.4.1 *Resultados*).

Componente 3

O metabolito identificado através da componente 3, que explica 7,1 % da amostra e se encontra na região entre 1,58 e 1,62 ppm, foi o II Butirato⁷ (Tabela 7). Apresentou um desvio químico de 1,562 ppm (Anexo 8 - Tabela 25 e Figuras 20 e 22), contribuindo para a identificação do grupo de doentes de Parkinson.

Tabela 7 - Metabolito discriminatório da componente 3, com a respetiva região do espetro que permite a discriminação, e coeficiente de regressão para o grupo doentes de Parkinson *versus* grupo Controlo.

^dPara o grupo Controlo o coeficiente de regressão é o simétrico.

Metabolitos	Região do espetro (ppm)	Coeficiente de regressão para o grupo de doentes de Parkinson ^d
II Butirato	1,58 - 1,62	0.403

⁷ O metabolito Butirato apresenta três sinais no espetro de RMN de ^1H (Tabela 25), sendo que se atribui o nome II Butirato ao segundo sinal apresentado por este metabolito a partir do valor de 0 ppm, com o desvio químico de 1,562 ppm, e I e III Butirato ao primeiro e terceiro sinais, respetivamente, com os desvios químicos de 0,88 e 2,14 ppm, realizando-se o mesmo para os metabolitos que apresentem mais do que um sinal no espetro de RMN NOESY 1D.

Em relação à discriminação dos indivíduos dos grupos de doentes de Parkinson e Controlo efetuada pela componente 3, obteve-se uma curva ROC com uma área de 0,9323 ($p < 0,001$), que corresponde a uma discriminação excepcional (40). A sensibilidade e especificidade máximas foram de 96,0 % e 84,6 %, respetivamente, para o valor de corte 0,470, com uma acurácia de 90,1 %. No entanto, ao avaliar-se o poder de discriminação do II Butirato, após validação cruzada, a área ROC obtida foi somente 0,6923, que corresponde a uma discriminação fraca (40). De qualquer modo, foi criado um modelo logístico com este metabolito (Tabela 7) e outros, de outras componentes, com o objetivo de evidenciar este poder de discriminação (ver secção 3.4.1 *Resultados*).

3.3.2. Análise discriminativa entre o grupo de doentes de Parkinson e o grupo Controlo, sexo Masculino

O objetivo desta análise foi a discriminação entre o grupo de doentes de Parkinson e Controlo, referente ao sexo Masculino. Para verificar se existe uma discriminação entre estes grupos recorreu-se à AEM para a criação de um modelo estatístico e assim que permitir a sua diferenciação através dos metabolitos identificados previamente em saliva.

Determinou-se por validação cruzada que o número ótimo de regiões do espectro que explicam as componentes 1, 2 e 3, são 1, 7 e 1, respetivamente (Tabela 8, 9 e 10).

A variância explicada pelos componentes 1, 2 e 3 foi 42,6 %, 8,7 % e 5,4 %, respetivamente, sendo 56,7 % o total de variância explicada pelas três componentes.

Na análise discriminativa dos grupos, pela utilização das componentes 1, 2 e 3, verificou-se que estas explicam 36,6 %, 12,1 % e 9,2 % da variância da variável Y, respetivamente, sendo a variância total explicada de 57,9 %.

3.3.2.1. Discriminação cruzada entre componentes: DP versus Controlo, sexo Masculino

Para a análise de discriminação cruzada entre componentes do grupo de doentes de Parkinson e Controlo, sexo Masculino, utilizaram-se os scores das componentes 1, 2 e 3 e obtiveram-se as Figura 7 e Figura 8. O facto de se ter utilizado a componente 1 como base para as duas análises, deve-se por esta explicar a maior variância de metabolitos (42,6 %). A variância explicada pelas componentes 2 e 3, foi de 8,7 % e 5,4 % respetivamente. Na discriminação cruzada entre componentes 1 e 2 e componentes 1 e 3, observa-se uma separação parcial entre os grupos de doentes de Parkinson e Controlo.

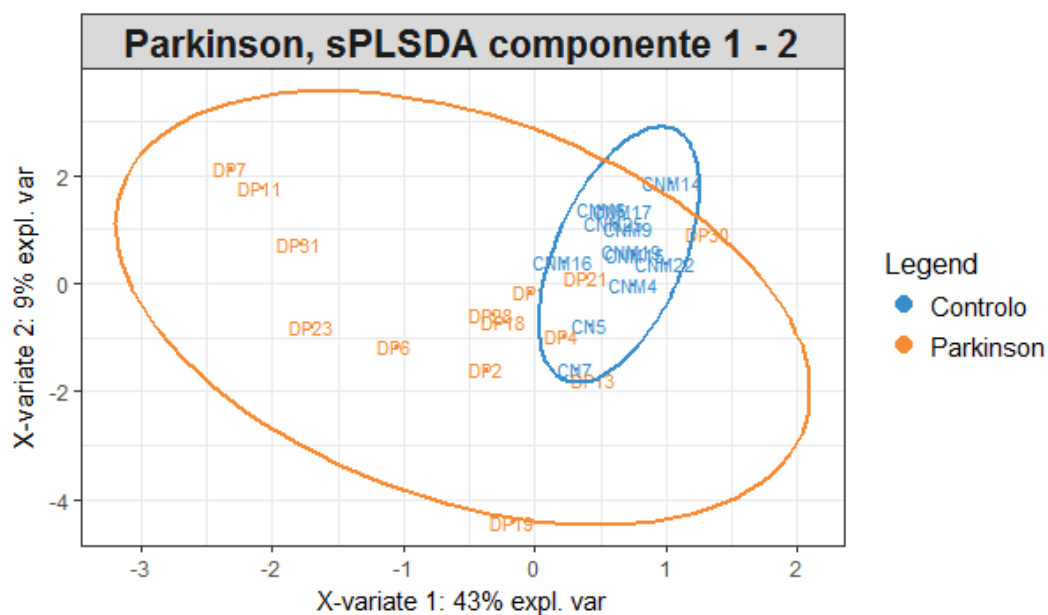


Figura 7 - Análises sPLS-DA pela discriminação cruzada entre as componentes 1 e 2, representando as regiões delimitadas o IC95% para cada grupo, grupo de doentes de Parkinson versus grupo Controlo, referente ao sexo Masculino.

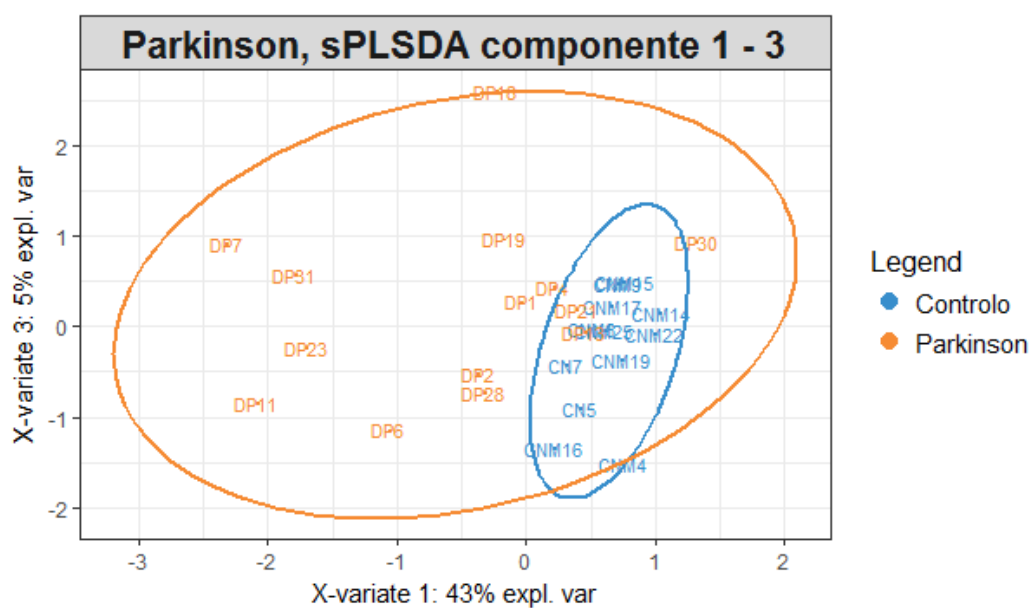


Figura 8 - Análises sPLS-DA pela discriminação cruzada entre as componentes 1 e 3, representando as regiões delimitadas o IC95% para cada grupo, grupo de doentes de Parkinson versus grupo Controlo, referente ao sexo Masculino.

3.3.2.2. Componentes doentes de Parkinson *versus* Controlo, sexo Masculino: metabolitos e curvas ROC

Componente 1

O único metabolito que definiu a componente 1 encontrava-se na região do espectro de RMN entre 1,18 a 1,22 ppm. Esse metabolito, que contribui para a discriminação dos dois grupos e que explica 44,9 % da amostra, identificou-se como I Etanol (Tabela 8), com um desvio químico de 1,188 ppm (Anexo 8 - Tabela 25 e Figuras 20 e 22), contribuindo para a identificação do grupo de doentes de Parkinson.

Tabela 8 - Metabolito discriminatório da componente 1, com a respetiva região do espectro que permite a discriminação, e coeficiente de regressão para o grupo doentes de Parkinson *versus* grupo Controlo, referente ao sexo Masculino.

^dPara o grupo Controlo o coeficiente de regressão é o simétrico.

Metabolito	Região do espectro (ppm)	Coeficiente de regressão para o grupo de doentes de Parkinson ^d
I Etanol	1,18 - 1,22	0,605

A componente 1 permite uma boa discriminação (40) entre os grupos doentes de Parkinson e Controlo, sexo Masculino (área ROC: 0,8929; $p < 0,001$). A sensibilidade e especificidade máximas foram de 85,7 % e 83,3 %, respetivamente, para o valor de corte 0,500, com uma acurácia de 84,6 %. Ao avaliar-se o poder discriminante do I Etanol por validação cruzada, constata-se que este metabolito mantém o mesmo poder discriminante, pois obteve-se uma área ROC aproximadamente igual a 0,8274. De qualquer modo, foi criado um modelo logístico com este metabolito (Tabela 8) e outros, de outras componentes, com o objetivo de evidenciar este poder de discriminação (ver secção 3.4.2 *Resultados*).

Componente 2

Na componente 2, que explica 8,7 % da amostra, foram identificadas 7 regiões do espectro de RMN que influenciam esta componente. No entanto, verificámos que certas regiões do espectro de RMN apenas traduzem diferenças na linha de base e que não representam sinais de metabolitos (Z_1 e Z_2 - Figura 9) - Assim, identificaram-se quatro possíveis metabolitos (Tabela 9) o I Propionato, o Malonato, o Lactato e o Metanol, com os desvios químicos de 1,061, 3,155, 1,32 e 3,369 ppm, respetivamente (Anexo 8 - Tabela 25 e Figura 22), contribuindo para a identificação do grupo de doentes de Parkinson, sexo masculino.

Tabela 9 - Metabolitos discriminatórios da componente 2 e regiões não identificadas (Z_1 e Z_2), com a respetiva região do espectro que permite a discriminação, e coeficiente de regressão para o grupo doentes de Parkinson *versus* grupo Controlo, referente ao sexo Masculino.

^dPara o grupo Controlo o coeficiente de regressão é o simétrico.

Metabolito	Regiões do espectro (ppm)	Coefficiente de regressão para o grupo de doentes de Parkinson ^d
Z_2	6,02 - 6,06	0,046
Metanol	3,37 - 3,41	0,073
Lactato	1,30 - 1,34	0,075
Z_2	6,10 - 6,14	0,080
Z_1	0,78 - 0,82	0,084
Malonato	3,14 - 3,18	-0,112
I Propionato	1,10 - 1,14	0,138

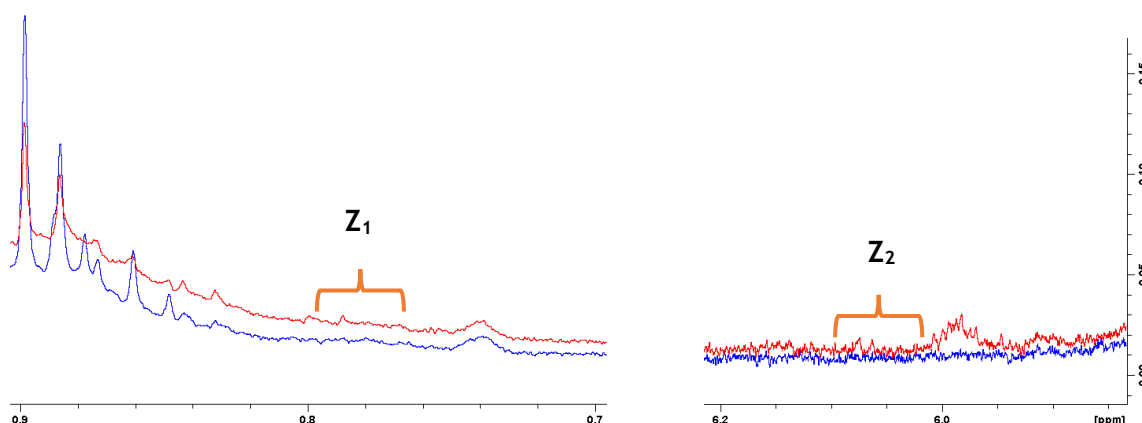


Figura 9 - Espectro de RMN ^1H , de uma amostra de saliva controlo, onde se encontram assinaladas as regiões do espectro onde não se detetou nenhum metabolito, Z_1 , Z_2 e Z_3 , apenas diferenças na linha de base.

Da análise ROC para a componente 2, relativa à discriminação entre os grupos doentes de Parkinson e Controlo, do sexo Masculino, obteve-se uma área de 0,8988 ($p < 0,001$), evidenciando uma boa discriminação (40). A sensibilidade e especificidade máximas foram de 85,7 % e 91,7 %, respetivamente, para o valor de corte 0,538, com uma acurácia de 88,5 %. No entanto, o poder discriminante desta componente ao ser reavaliado por validação cruzada, obteve-se uma área ROC inferior a 0,8 (0,7917), passando a ser uma discriminação aceitável (40). De qualquer modo, foi criado um modelo logístico com estes metabolitos (Tabela 9) e outros, de outras componentes, com o objetivo de evidenciar este poder de discriminação (ver secção 3.4.2 *Resultados*).

Componente 3

O metabolito identificado que contribui para a componente 3, que explica 5,4 % da amostra, foi o Malonato (Tabela 10), com desvio químico de 3,155 ppm (Anexo 8 - Tabela 25 e Figura 22), contribuindo para a identificação do grupo de doentes de Parkinson, sexo Masculino.

Tabela 10 - Metabolito discriminatório da componente 3, com a respetiva região do espectro que permite a discriminação, e coeficiente de regressão para o grupo doentes de Parkinson *versus* grupo Controlo, referente ao sexo Masculino.

^dPara o grupo CN o coeficiente de regressão é o simétrico.

Metabolito	Região do espectro (ppm)	Coeficiente de regressão para o grupo de doentes de Parkinson ^d
Malonato	3,14 - 3,18	0,105

Da análise ROC da componente 3, relativa à discriminação entre os grupos de doentes de Parkinson e CN do sexo masculino, obteve-se uma área de 0,9524 ($p < 0,001$), que corresponde a uma discriminação excecional (40). A sensibilidade e especificidade máximas foram de 92,9% e 91,7 %, respetivamente, para o valor de corte de 0,500, com uma acurácia de 92,3 %. No entanto, ao reavaliar-se o poder discriminante do Malonato, por validação cruzada obteve-se uma área ROC de 0,8512, embora continue a evidenciar uma boa discriminação (40). De qualquer modo, foi criado um modelo logístico com este metabolito (Tabela 10) e outros, de outras componentes, com o objetivo de evidenciar este poder de discriminação (ver secção 3.4.2 *Resultados*).

3.3.3. Análise discriminativa entre o grupo de doentes de Parkinson e o grupo Controlo, sexo Feminino

O objetivo desta análise foi a discriminação entre o grupo de doentes de Parkinson e Controlo, referente ao sexo Feminino. Para verificar se existe uma discriminação entre estes dois grupos, recorreu-se à AEM para a criação de um modelo estatístico e, assim, permitir a sua diferenciação através dos metabolitos identificados previamente em saliva.

Determinou-se por validação cruzada que o número ótimo de metabolitos que explicam as componentes 1, 2 e 3, são o 1, 1 e 8 respetivamente (Tabelas 11, 12 e 13).

A variância explicada pelos componentes 1, 2 e 3 foi de 56,7 %, 1,1 % e 10,8 %, respetivamente, sendo 68,6 % o total de variância explicada pelas três componentes.

Na análise discriminativa dos grupos, pela utilização das componentes 1, 2 e 3, verificou-se que estas explicam 34,9 %, 11,6 % e 6,0 % da variância da variável Y, respetivamente, sendo a variância total explicada de 52,5 %.

3.3.3.1. Discriminação cruzada entre componentes: doentes de Parkinson *versus* Controlo, sexo Feminino

A discriminação cruzada entre as componentes 1-2 e 1-3 permitiu uma separação parcial entre os dois grupos, como demonstrado nas Figuras 11 e 12.

Novamente, a discriminação cruzada foi efetuada utilizando os scores, isto é, a posição de cada indivíduo na componente, sempre com a utilização da componente 1 como base, uma vez que explica a maior variância de metabolitos entre o grupo de doentes de Parkinson e Controlo, sexo Feminino (56,7%). A variância explicada pelas componentes 2 e 3 é muito menor, respetivamente 1,1% e 10,8%.

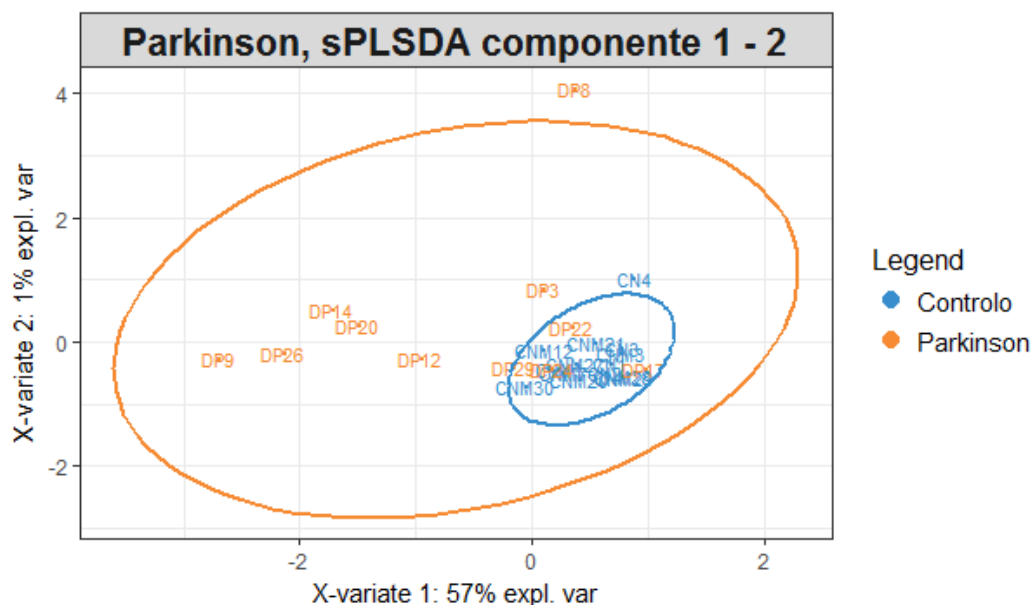


Figura 11 - Análises sPLS-DA pela discriminação cruzada entre as componentes 1 e 2, representando as regiões delimitadas o IC95% para cada grupo, grupo de doentes de Parkinson versus grupo Controlo, referente ao sexo Feminino.

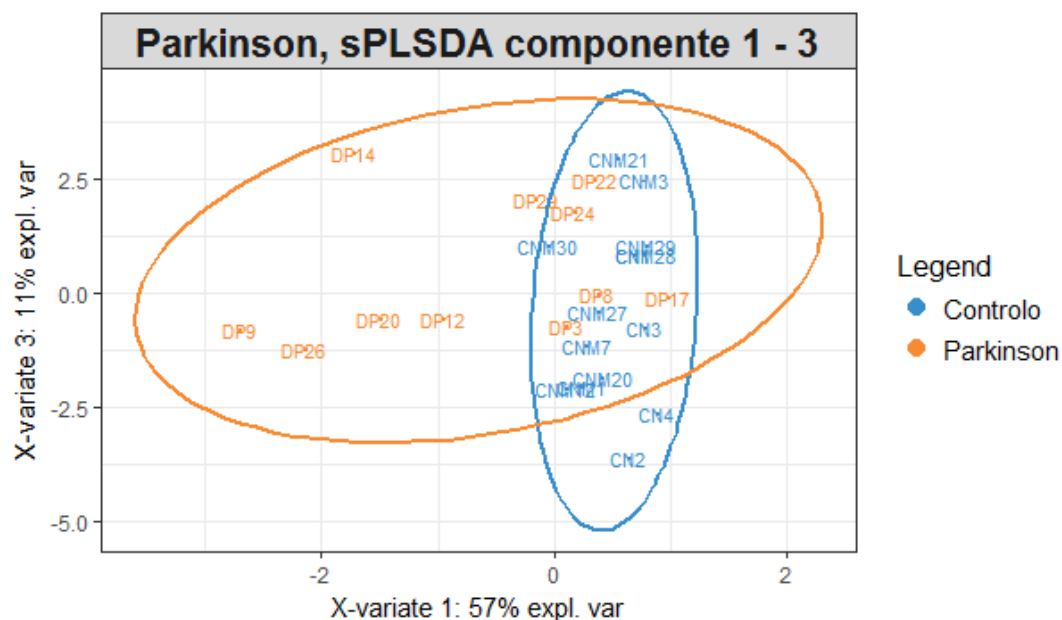


Figura 10 - Análises sPLS-DA pela discriminação cruzada entre as componentes 1 e 3, representando as regiões delimitadas o IC95% para cada grupo, grupo de doentes de Parkinson versus grupo Controlo, referente ao sexo Feminino.

3.3.3.2. Componentes doentes de Parkinson *versus* Controlo, sexo Feminino: metabolitos e curvas ROC

Componente 1

O metabolito identificado que contribui para esta componente foi o Óxido de Trimetilamina (Tabela 11), com desvio químico de 3,202 ppm (Anexo 8 - Tabela 25 e Figura 22), contribuindo para a identificação do grupo de doentes de Parkinson.

Tabela 11 - Metabolito discriminatório da componente 1, com a respetiva região do espectro que permite a discriminação, e coeficiente de regressão para o grupo doentes de Parkinson *versus* grupo Controlo, referente ao sexo Feminino.

^dPara o grupo Controlo o coeficiente de regressão é o simétrico.

Metabolito	Região do espectro (ppm)	Coeficiente de regressão para o grupo de doentes de Parkinson ^d
Oxido de trimetilamina	3,22 - 3,24	0,591

Da análise ROC da componente 1, relativa à discriminação dos indivíduos do sexo Feminino dos grupos doentes de Parkinson e Controlo, obteve-se uma área de 0,8312 ($p=0,005$), que corresponde a uma boa discriminação (40). A sensibilidade e especificidade máximas foram de 90,1 % e 71,4 %, respetivamente, para o valor de corte 0,480, com uma acurácia de 80,0 %. O poder discriminante desta componente também foi reavaliado por validação cruzada, pelo que a área ROC reduziu para 0,7792. De qualquer modo, foi criado um modelo logístico com este metabolito (Tabela 11) e outros, de outras componentes, com o objetivo de evidenciar este poder de discriminação (ver secção 3.4.3 *Resultados*).

Componente 2

O metabolito identificado que contribui para esta componente foi o Formato (Tabela 12), com desvio químico de 8,450 ppm (Anexo 8 - Tabela 25 e Figura 22), permitindo a identificação do grupo de doentes de Parkinson, sexo Feminino.

Tabela 12 - Metabolito discriminatório da componente 2, com a respetiva região do espectro que permite a discriminação, e coeficiente de regressão para o grupo doentes de Parkinson *versus* grupo Controlo, referente ao sexo Feminino.

^dPara o grupo Controlo o coeficiente de regressão é o simétrico.

Metabolito	Região do espectro (ppm)	Coeficiente de regressão para o grupo de doentes de Parkinson ^d
Formato	8,46 - 8,50	0,356

Da análise ROC da componente 2, relativa à discriminação entre os indivíduos do sexo Feminino dos grupos doentes de Parkinson e Controlo, obteve-se uma área de 0,8831 ($p=0,001$), que corresponde a uma boa discriminação (40). A sensibilidade e especificidade máximas foram de 81,8 % e 92,9 %, respetivamente, para o valor de corte 0,640, com uma acurácia de 88,0 %. O poder discriminante desta componente também foi reavaliado por validação cruzada, pelo

que a área ROC reduziu para 0,7857. De qualquer modo, foi criado um modelo logístico com este metabolito (Tabela 12) e outros, de outras componentes, com o objetivo de evidenciar este poder de discriminação (ver secção 3.4.2 *Resultados*).

Componente 3

Na componente 3, foram identificadas 8 regiões do espectro de RMN que influenciam esta componente. No entanto, verificámos que estas regiões do espectro de RMN apenas traduzem diferenças na linha de base, que não representam sinais de metabolitos, Z_3 (Tabela 13 e Figura 12).

Tabela 13 - Regiões do espectro de RMN que contribuem para explicar a variabilidade dos grupos em estudo, permitindo diferenciá-los. Regiões que influenciam a componente 3, para a DP, com ordem crescente de relevância, grupo doentes de Parkinson versus grupo Controlo, referente ao sexo Feminino. ^dPara o grupo Controlo o coeficiente de regressão é o simétrico.

Metabolito	Regiões do espectro (ppm)	Coefficiente de regressão para o grupo de doentes de Parkinson ^d
Z_3	6,51 - 6,55	-0,001
	6,42 - 6,46	-0,012
	6,66 - 6,70	-0,027
	6,62 - 6,64	-0,034
	6,58 - 6,62	-0,038
	6,38 - 6,42	-0,053
	6,26 - 6,30	-0,077
	6,46 - 6,50	0,080

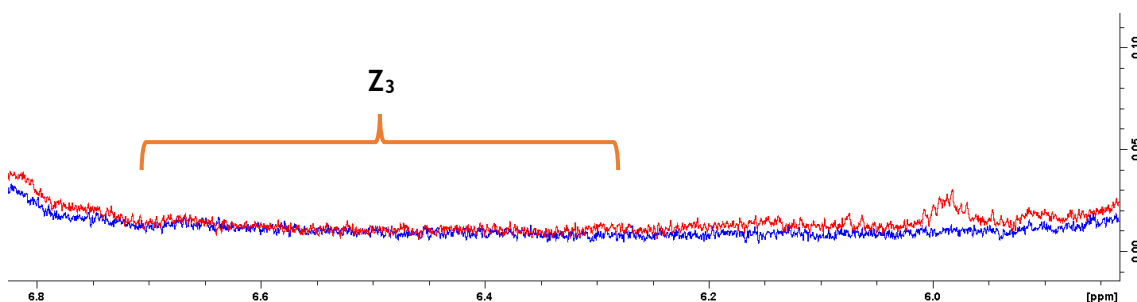


Figura 12 - Espectro de RMN de ^1H , de uma amostra de saliva controlo (azul) e saliva doente de Parkinson, onde se encontra assinalado as regiões do espectro onde não se detetou nenhum metabolito, Z_3 , apenas diferenças na linha de base.

3.3.4. Análise discriminativa entre os três subgrupos do grupo de doentes de Parkinson e o grupo Controlo

O objetivo desta análise foi a discriminação entre os subgrupos I, II e III do grupo de doentes de Parkinson e Controlo. Para verificar se existe uma discriminação entre estes quatro grupos, recorreu-se à AEM para a criação de um modelo estatístico e assim que permitir a sua diferenciação através dos metabolitos identificados previamente em saliva.

Determinou-se por validação cruzada, que o número ótimo de metabolitos que explicam as componentes 1, 2 e 3, são 7, 1 e 12, respetivamente (Tabelas 14, 16 e 18).

A variância explicada dos dados pelas componentes 1, 2 e 3 foi 53,5 %, 5,6 % e 8,5 % respetivamente, sendo 67,6 % o total de variância explicada pelas três componentes.

Na análise discriminativa dos grupos, pela utilização das componentes 1, 2 e 3, verificou-se que estas explicam 38,8 %, 1,2 % e <0,1 % da variância da variável Y, respetivamente, sendo a variância total explicada de 57,9 %.

3.3.4.1. Discriminação cruzada entre componentes: DP (subgrupos) *versus* Controlo

A discriminação cruzada entre as componentes 1-2 e 1-3 permitiu uma separação parcial entre os quatro grupos, como demonstrado nas Figuras 13 e 14.

Uma vez mais, a discriminação cruzada foi efetuada utilizando os scores, isto é, a posição de cada indivíduo na componente, sempre com a utilização da componente 1 como base, que apresenta a maior variância de metabolitos entre o grupo de doentes de Parkinson e Controlo (53,5 %). A variância explicada pelas componentes 2 e 3 é muito menor, respetivamente 5,6 % e 8,5 %.

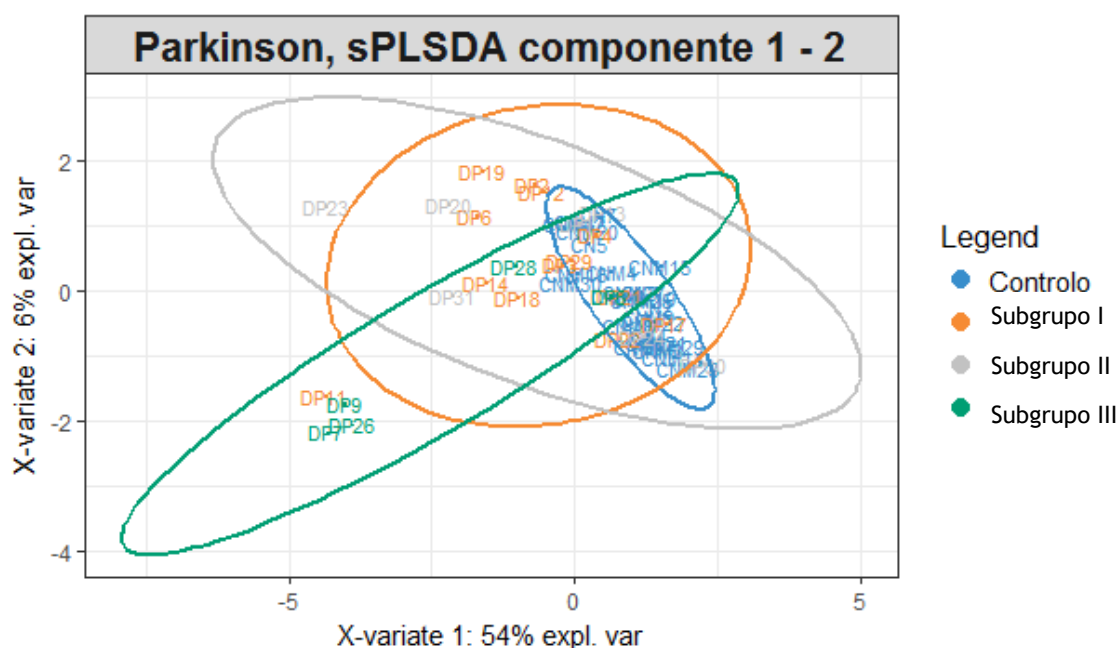


Figura 13 - Análises sPLS-DA pela discriminação cruzada entre as componentes 1 e 2, representando as regiões delimitadas o IC95% para cada grupo, subgrupos do grupo de doentes de Parkinson *versus* grupo Controlo.

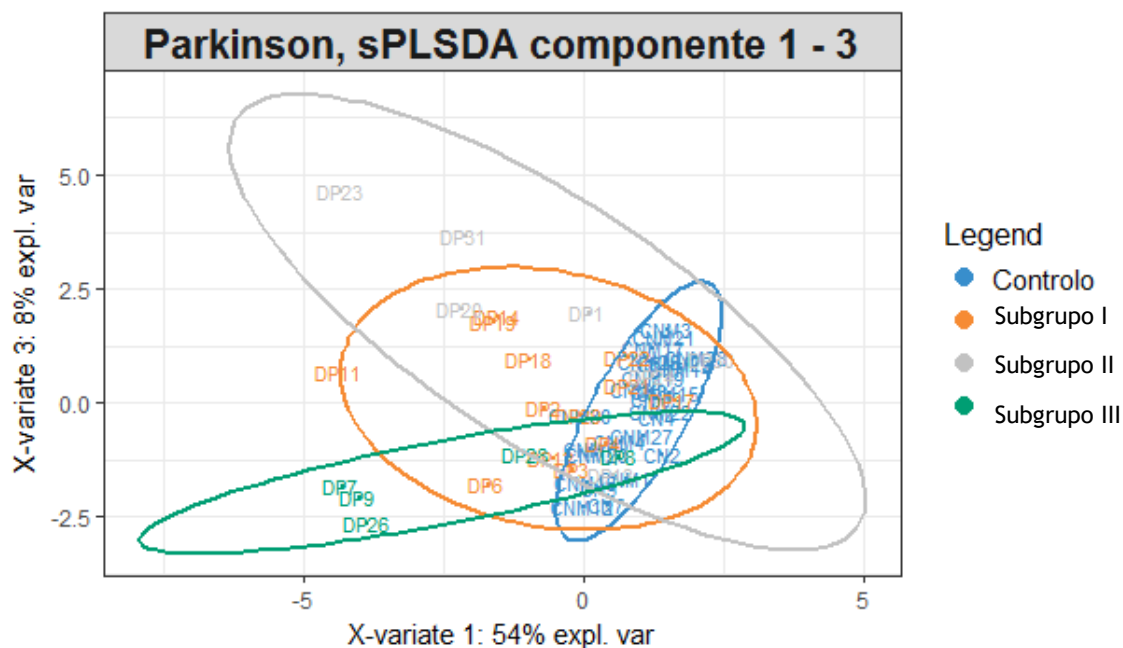


Figura 14 - Análises sPLS-DA pela discriminação cruzada entre as componentes 1 e 3, representando as regiões delimitadas do IC95% para cada grupo, subgrupos do grupo de doentes de Parkinson *versus* grupo Controlo.

3.3.4.2. Componentes doentes de Parkinson (subgrupos) *versus* Controlo: metabolitos e tabelas de classificação

Componente 1

Na componente 1, que explica 53,5% da amostra, foram identificadas sete regiões do espectro de RMN que influenciam esta componente. Essas regiões correspondem aos seguintes metabolitos: I Etanol, II Etanol, II Butirato, Glicina, Óxido de trimetilamina e Formato (Tabela 14, Anexo 8 - Tabela 25 e Figura 22). Apesar disso, não foi possível a identificação de um metabolito na região 1,38 - 1,42, que designámos X_3 (Figura 15). Estes permitem a identificação dos diferentes subgrupos do grupo de doentes de Parkinson, mas com maior relevância na identificação do subgrupo III.

Tabela 14 - Regiões do espectro de RMN que explicam a variabilidade dos grupos em estudo, permitindo diferenciá-los. Metabolitos identificados, respeitantes às áreas que influenciam a componente 1, respeitante ao subgrupo III, com ordem crescente de importância, subgrupos do grupo doentes de Parkinson *versus* grupo Controlo.

Metabolito	Região do espectro (ppm)	Coeficiente de regressão			
		Controlo	Subgrupo I	Subgrupo II	Subgrupo III
Formato	8,50 - 8,54	-0,022	0,008	0,006	0,019
Óxido trimetilamina	3,22 - 3,26	-0,033	0,012	0,009	0,028
Glicina	3,58 - 3,62	-0,036	0,013	0,009	0,030
II Butirato	1,58 - 1,62	-0,047	0,017	0,012	0,039
X_3	1,38 - 1,42	-0,050	0,019	0,013	0,042
II Etanol	3,70 - 3,74	-0,140	0,052	0,037	0,117
I Etanol	1,18 - 1,22	-0,284	0,105	0,075	0,237

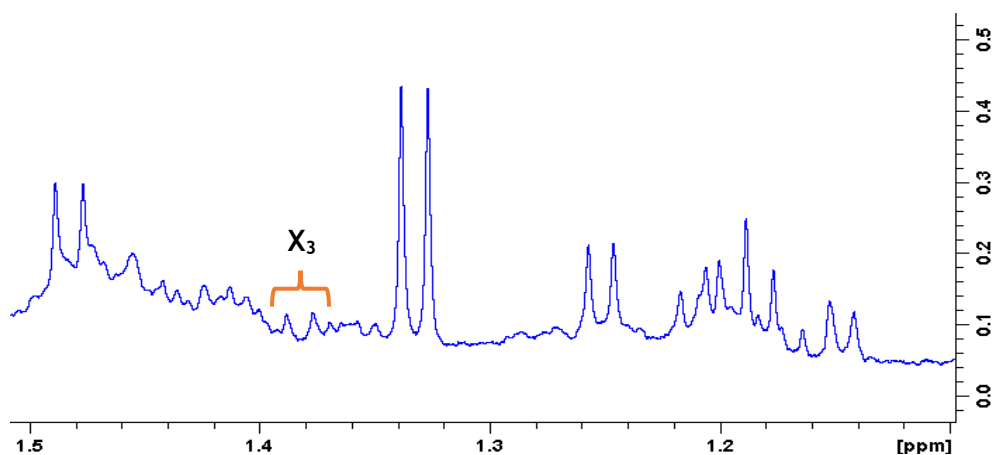


Figura 15 - Espectro de RMN de ^1H , de uma amostra de saliva controlo, com o metabolito não identificado assinalado com X_3 .

Na Tabela 15 encontram-se as percentagens de indivíduos corretamente classificados pela componente 1. Verificou-se que a totalidade dos controlos foi corretamente classificada por esta componente, mas para o subgrupo I a percentagem de indivíduos corretamente classificados foi de apenas 30,8 %. Relativamente aos subgrupos II e III todos os indivíduos foram mal classificados. Assim, a acurácia para a componente 1 verificou-se ser igual a 58,8 %.

Tabela 15 - Tabela de Classificação para a Componente 1, subgrupos do grupo doentes de Parkinson *versus* grupo Controlo.

		Preditos				Corretamente Preditos (%)
		Controlo	Subgrupo I	Subgrupo II	Subgrupo III	
Observados	Controlo	26	0	0	0	100,0 %
	Subgrupo I	9	4	0	0	30,8 %
	Subgrupo II	4	3	0	0	0,0 %
	Subgrupo III	2	3	0	0	0,0 %

Componente 2

O metabolito identificado que contribui para a componente 2, que explica 5,6 % da amostra, no entanto não foi possível a sua identificação, X_4 (Figura 16), pelo facto de não estar descrito na literatura. Este contribui para a identificação dos diferentes subgrupos do grupo de doentes de Parkinson, mas com maior relevância na identificação do subgrupo II.

Tabela 16 - Regiões do espectro de RMN que explicam a variabilidade dos grupos em estudo, permitindo diferenciá-los. Metabolitos identificados, respeitantes às áreas que influenciam a componente 2, respeitante ao Subgrupo II, subgrupos do grupo doentes de Parkinson *versus* grupo Controlo.

Metabolito	Região do espectro (ppm)	Coeficiente de regressão			
		Controlo	Subgrupo I	Subgrupo I	Subgrupo I
X_4	1,10 - 1,14	-0,113	0,252	0,190	-0,399

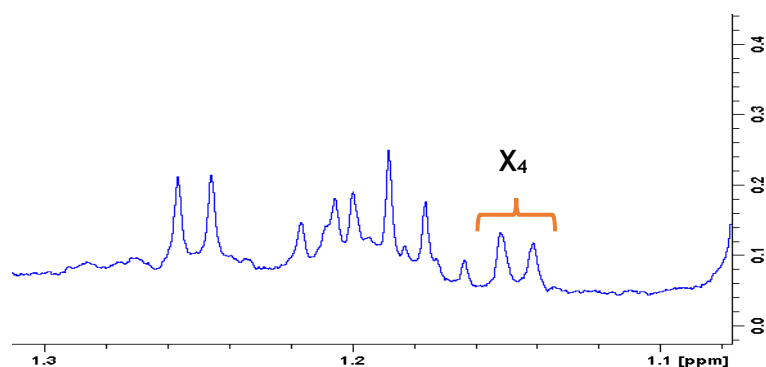


Figura 16 - Espectro de RMN de ^1H , de uma amostra de saliva controlo, onde se encontram assinalada a região do espectro onde se detetou um metabolito não identificado, X_4 .

Na Tabela 17 encontram-se as percentagens de indivíduos corretamente classificados pela componente 2. Verificou-se que a totalidade dos Controlos foram corretamente classificados por esta componente e classificou corretamente 38,5 % e 60,0 % dos indivíduos dos subgrupos I e III, respetivamente. Todos os indivíduos do subgrupo II foram incorretamente classificados por esta componente. Verificou-se que a acurácia da componente 2 foi de 66,7 %.

Tabela 17 - Tabela de Classificação para a Componente 2, subgrupos do grupo doentes de Parkinson *versus* grupo Controlo.

		Preditos				Corretamente Preditos (%)
		Controlo	Subgrupo II	Subgrupo II	Subgrupo III	
Observados	Controlo	26	0	0	0	100,0 %
	Subgrupo I	7	5	0	1	38,4 %
	Subgrupo II	4	3	0	0	0,0 %
	Subgrupo III	1	1	0	3	60,0 %

Componente 3

Na componente 3 foram identificadas doze regiões do espectro de RMN que influenciam esta componente (Tabela 18). Apesar disso, entre estas não foi possível a identificação dos metabolitos em determinadas regiões do espectro, X_5 (Figura 17), pelo facto de não estarem descritos na literatura. Também verificámos que certas regiões do espectro apenas traduzem diferenças na linha de base, não representando sinais de metabolitos (Z_4 - Tabela 18 e Figura 17).

Tabela 18 - Regiões do espectro de RMN que contribuem para explicar a variabilidade dos grupos em estudo, permitindo diferenciá-los, com ordem crescente de importância. Todas as regiões influenciam a componente 3, mas com maior relevância para o subgrupo III, subgrupos do grupo doentes de Parkinson *versus* grupo Controlo.

Metabolito	Regiões do espectro (ppm)	Coeficiente de regressão			
		Controlo	Subgrupo I	Subgrupo II	Subgrupo III
Z ₄	6,70 - 6,74	0,002	-0,001	-0,009	0,007
	6,46 - 6,50	0,004	-0,001	-0,016	0,013
	2,86 - 2,90	0,005	-0,001	-0,019	0,015
	6,74 - 6,78	0,006	-0,002	-0,023	0,019
	6,50 - 6,54	0,010	-0,003	-0,035	0,029
	6,62 - 6,66	0,014	-0,004	-0,050	0,041
	6,66 - 6,70	0,014	-0,004	-0,051	0,042
	6,58 - 6,62	0,015	-0,004	-0,055	0,045
	6,38 - 6,42	0,016	-0,005	-0,060	0,049
	6,54 - 6,58	0,018	-0,005	-0,067	0,055
	1,14 - 1,18	0,043	-0,013	-0,158	0,129
X ₅	6,90 - 6,94	0,062	-0,018	-0,228	0,186

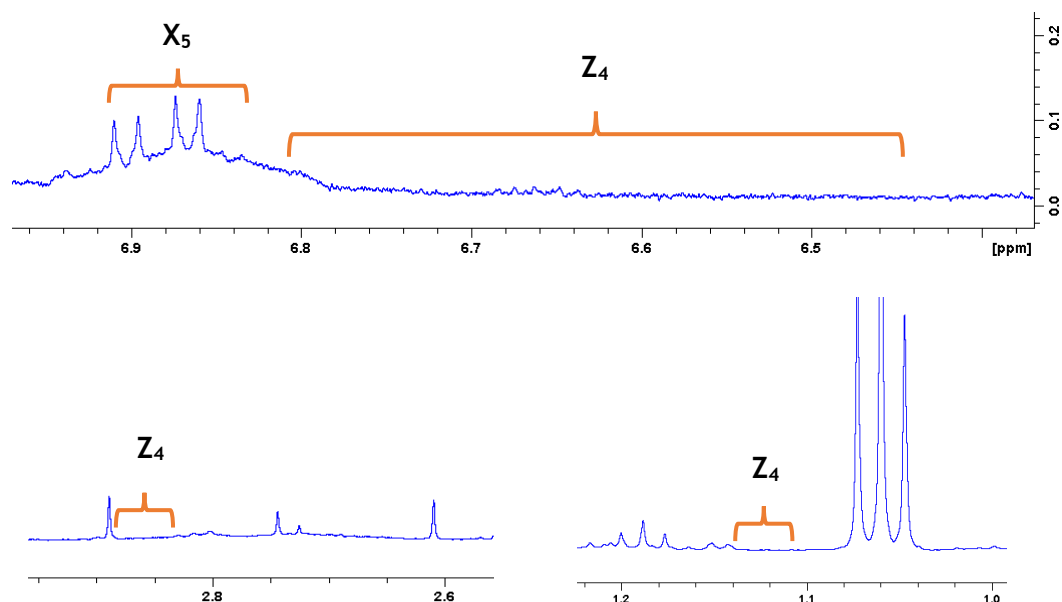


Figura 17 - Espectro de RMN de ¹H, de uma amostra de saliva controlo, onde se encontram assinaladas as regiões do espectro que detetaram dois metabolitos não identificados, X₅, e onde não se detetou nenhum metabolito, Z₄, apenas diferenças na linha de base.

Na Tabela 19 encontram-se as percentagens de indivíduos corretamente classificados pela componente 3. Verificou-se que a totalidade dos Controlos foram corretamente classificados por esta componente, tendo classificado corretamente 30,8 %, 42,9 % e 60,0 % dos indivíduos dos subgrupos I, II e III, respetivamente. A acurácia desta componente é igual a 70,6%.

Tabela 19 - Tabela de Classificação para a Componente 3, relativa aos subgrupos do grupo de doentes de Parkinson versus grupo Controlo.

		Preditos				Corretamente Preditos (%)
		Controlo	Subgrupo I	Subgrupo II	Subgrupo III	
Observados	Controlo	26	0	0	0	100,0 %
	Subgrupo I	7	4	1	1	30,8 %
	Subgrupo II	3	1	3	0	42,9 %
	Subgrupo III	2	0	0	3	60,0 %

3.4. Análise complementar com regressão logística

Como complemento à sPLS-DA foram criados modelos de regressão logística com os metabolitos mais relevantes das componentes e, assim, produziu-se um modelo que permita a predição da variável Y, categórica (doença de Parkinson e controlo, referente ao total da nossa amostra, referente ao sexo Masculino e Feminino, e subgrupos da doença de Parkinson e controlo) para as respetivas análises.

3.4.1. Grupo doentes de Parkinson versus Grupo Controlo

Na Tabela 20, encontra-se sintetizado o modelo logístico obtido com os metabolitos mais expressivos das componentes 1, 2 e 3, que foram o I Etanol, o Malonato e o II Butirato, respetivamente. Os dados das respetivas áreas dessas regiões do espectro foram previamente alterados de unidade para 1 milhão devido à ordem de grandeza dos valores do espectro. Verifica-se que a probabilidade de um indivíduo ter DP aumenta aproximadamente 72 % com o aumento de uma unidade de área do metabolito I Etanol, na nova unidade de área, e, aproximadamente 57 % com o aumento do metabolito II Butirato. No entanto, para o metabolito Malonato a probabilidade de ter DP é reduzida em aproximadamente 65 %, com o aumento de uma unidade de área.

Tabela 20 - Dados da regressão logística criada para diferenciação entre o grupo de doentes de Parkinson e o grupo Controlo, com os 3 metabolitos mais influentes nas 3 componentes. Devido à ordem de grandeza dos dados estes foram convertidos dividindo por 10⁶.

* Valores em 1 milhão de unidades de área, IC: Intervalo de Confiança ^cTeste de Wald

Metabolitos	Coefficiente de Regressão	Odds Ratio [IC95%]	Valor de p ^c
I Etanol*	0,543	1,72 [1,17; 2,522]	0,005
Malonato*	-1,058	0,35 [0,17; 0,73]	0,005
II Butirato*	0,449	1,57 [1,08; 2,27]	0,017

Com este modelo, definido pela Equação 1, onde o nome dos metabolitos refere-se à área da região do espectro onde são identificados, obtém-se uma discriminação excecional (40) entre os indivíduos dos grupos doentes de Parkinson e Controlo (área ROC= 0,934; IC95% [0,866; 1,000]), com uma sensibilidade de 88,0 % e especificidade de 92,3 % para o valor de corte 0,511.

$$P(y = DP) = \frac{1}{1 + e^{-\left(-3,7 + 0,543 \times \frac{I \text{ Etanol}}{1 \times 10^6} - 1,058 \times \frac{M \text{alonato}}{1 \times 10^6} + 0,449 \times \frac{II \text{ Butirato}}{1 \times 10^6}\right)}} \quad (1)$$

3.4.2. Grupo doentes de Parkinson *versus* Grupo Controlo, sexo Masculino

Na Tabela 21 está sintetizado o modelo logístico obtido com os metabolitos mais expressivos das componentes 1, 2 e 3, que são o I Etanol e o Malonato. Os dados das respetivas áreas dessas regiões do espectro foram previamente alterados de unidade para 1 milhão, devido à ordem de grandeza dos valores do espectro. O metabolito I Propionato, apresentava um valor *p* superior a 0,2 pelo que foi excluído da regressão logística, como referido anteriormente em *Material e Métodos*. Verifica-se que a probabilidade de um indivíduo ter DP aumenta aproximadamente 80 % com o aumento de uma unidade de área do metabolito I Etanol. No entanto, para o metabolito Malonato a probabilidade de ter DP reduz-se em aproximadamente 52%.

Tabela 21 - Dados da regressão logística criada para diferenciação entre o grupo de doentes de Parkinson e o grupo Controlo, referente ao sexo Masculino, com os 2 metabolitos mais influentes nas componentes 1 e 3. Devido à ordem de grandeza dos dados estes foram convertidos dividindo por 10⁶.

* Valores em 1 milhão de unidades de área, IC: Intervalo de Confiança ^cTeste de Wald

Metabolitos	Coefficiente de Regressão	Odds Ratio [IC95%]	Valor de <i>p</i> ^c
I Etanol*	0,588	1,80 [1,09; 2,97]	0,022
Malonato*	-0,729	0,48 [0,19; 1,26]	0,137

Com este modelo, definido pela equação 2, onde o nome dos metabolitos refere-se à área da região do espectro onde são identificados, obtém-se uma boa discriminação (40) entre os indivíduos dos grupos doentes de Parkinson e Controlo (área ROC= 0,899; IC95% [0,761; 1,000]), com sensibilidade de 85,7 % e especificidade de 100 % para o valor de corte 0,541.

$$P(y = DP) = \frac{1}{1 + e^{-\left(-4,221 + 0,588 \times \frac{I \text{ Etanol}}{1 \times 10^6} - 0,729 \times \frac{M \text{alonato}}{1 \times 10^6}\right)}} \quad (2)$$

3.4.3. Grupo doentes de Parkinson *versus* Grupo Controlo, sexo Feminino

Na Tabela 22 encontra-se sintetizado o modelo logístico obtido com os metabolitos mais expressivos das componentes 1 e 2, que são o Óxido de Trimetilamina e o Formato. Os dados foram previamente alterados de unidade para 1 milhão devido à ordem de grandeza dos valores do espectro. As regiões do espectro da componente 3 não foram consideradas por não representarem metabolitos. Verifica-se que a probabilidade de um indivíduo ter DP aumenta

aproximadamente 16 % com o aumento de uma unidade de área do metabolito Óxido de trimetilamina, e de aproximadamente 13 % com o aumento do metabolito Formato.

Tabela 22 - Dados da regressão logística criada para diferenciação entre o grupo de doentes de Parkinson e o grupo Controlo, com os 2 metabolitos mais influentes nas 2 componentes. Devido à ordem de grandeza dos dados estes foram convertidos dividindo por 10^6 .

* Valores em 1 milhão de unidades de área, IC: Intervalo de Confiança ^cTeste de Wald

Metabolitos	Coefficiente de Regressão	Odds Ratio [IC95%]	Valor de p^c
Óxido de trimetilamina*	0,149	1,16 [0,97; 1,39]	0,102
Formato*	0,117	1,13 [0,94; 1,34]	0,191

Com este modelo, definido pela equação 3, onde o nome dos metabolitos refere-se à área da região do espectro onde são identificados, consegue-se uma boa discriminação (40) dos indivíduos dos grupos doentes de Parkinson e grupo Controlo (área ROC= 0,883; IC95% [0,710; 1,000]), obtendo-se uma sensibilidade e especificidade de 81,8 % e 92,9 %, respetivamente, para o valor de corte 0,411.

$$P(y = DP) = \frac{1}{1 + e^{-\left(-4,145 + 0,149 \times \frac{\text{Óxido trimetilamina}}{1 \times 10^6} + 0,117 \times \frac{\text{Formato}}{1 \times 10^6}\right)}} \quad (3)$$

3.4.4. Grupo doentes de Parkinson versus Grupo Controlo, referente aos subgrupos DP

Nesta análise foi obtido um modelo de regressão logística ordinal usando-se como preditor o único metabolito, I Etanol, que mostrou ter poder de discriminação para os subgrupos da DP, determinado estatisticamente (como referido na secção de *Material e Métodos*).

Para avaliar se o metabolito I Etanol apresenta um efeito significativo sobre as probabilidades dos subgrupos da DP, ajustou-se um modelo de regressão logística ordinal com a função de ligação *Cauchit*, de modo a permitir uma melhor discriminação entre os subgrupos I e II do grupo de doentes de Parkinson, que anteriormente se revelava difícil.

Os coeficientes e a significância do modelo logístico ajustado encontram-se resumidos na Tabela 23, para a diferenciação entre os subgrupos I e II do grupo de doentes de Parkinson e Controlo.

Tabela 23 - Dados da regressão logística criada para diferenciação entre os subgrupos do grupo de doentes de Parkinson e o grupo Controlo, o I Etanol.

* Valores em 1 milhão de unidades de área, IC: Intervalo de Confiança ^cTeste de Wald

		Estimativa Coeficientes	IC95%	Valor p ^c
<i>Threshold</i>	Controlo	3,710	[1,253; 6,167]	0,003
	Subgrupo 1	5,987	[2,250; 9,724]	0,002
	Subgrupo 2	8,521	[3,208; 13,835]	0,002
Metabolito I Etanol*		0,235	[0,082; 0,388]	0,003

Deste modo, obteve-se o modelo representado pela equação 4, que permite estimar as probabilidades para cada grupo, sendo que metabolito na equação representa a sua área no espectro de RMN, onde α_k , com $k = 0, 1, 2$. representa o *threshold* do Controlo, subgrupo 1 e subgrupo 2.

$$\hat{P}(\text{Estádio} \leq k) = \frac{1}{\pi} \arctg(\alpha_k - 0,235 \text{ I Etanol}) \quad (4)$$

Este modelo classifica corretamente cerca de 67 % dos indivíduos da amostra (Tabela 24). A tabela mostra os valores de corte, em milhões de unidades de área, estimados pelo modelo logístico ordinal para o metabolito I Etanol, que permite a discriminação dos indivíduos nos três subgrupos. Na Figura 18 podem ser observadas a evolução das probabilidades estimadas pelo modelo logístico ordinal, onde estão assinalados os valores de corte anteriormente referidos.

Tabela 24 - Tabela de classificação do modelo ordinal, subgrupos do grupo de doentes de Parkinson *versus* grupo Controlo.

		Predito				Corretamente Preditos (%)
		Controlo	Subgrupo I	Subgrupo II	Subgrupo III	
Observado	Controlo	25	1	0	0	96,2 %
	Subgrupo I	5	6	1	1	46,2 %
	Subgrupo II	3	2	2	0	28,6 %
	Subgrupo III	1	1	2	1	20,0 %
Valores de corte		16,772	25,382	35,384		

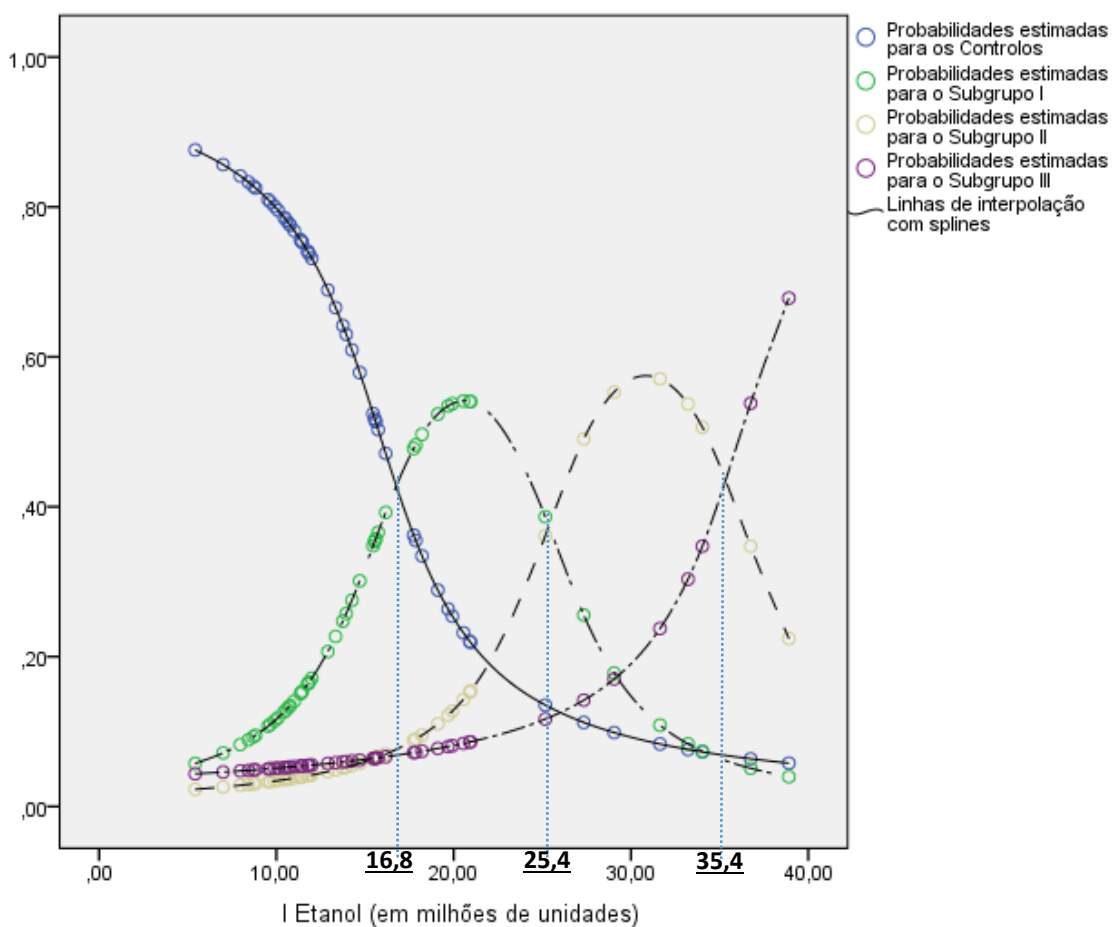


Figura 18 - Evolução das probabilidades estimadas pelo modelo logístico ordinal para cada uma das categorias dos subgrupos da DP.

4. Discussão

A DP é uma doença neurodegenerativa cujos estudos epidemiológicos apontam para uma maior prevalência no sexo masculino e idade média à altura do diagnóstico de 70,5 anos (41). No nosso estudo, o grupo de doentes de Parkinson apresentava uma distribuição por sexo semelhante à da população de DP, com idade média à altura do diagnóstico ligeiramente superior (75,0 anos \pm 6,9 anos).

Na nossa amostra o grupo Controlo tem uma distribuição de género semelhante ao grupo de doentes de Parkinson, mas com idade média significativamente menor, de 69,0 \pm 7,2 anos. Esta diferença é explicada à custa dos indivíduos do sexo feminino do grupo Controlo, que apresentam idade média inferior de 69,1 \pm 7,7 anos, visto terem sido recrutados a partir das consultas externas de Uro-Ginecologia, nas quais a idade média é inferior à idade dos indivíduos femininos com DP.

Ao comparar o historial médico dos indivíduos, verifica-se que o grupo de doentes de Parkinson apresenta um maior número de comorbilidades (Tabela 3). Além disso, verificamos que o tipo de patologias é distinto entre os dois grupos. No grupo Controlo 69,2 % dos indivíduos apresentavam doença metabólica (*versus* 36,0 % no grupo de doentes de Parkinson; $p = 0,025$). Por outro lado, o grupo de doentes de Parkinson incluiu um maior número de indivíduos com doença renal crónica em estágio 3 (32,0 %, *versus* 3,8 % no grupo Controlo; $p = 0,011$) e um maior número de indivíduos com doença psiquiátrica (56,0 %, *versus* 15,4 % no grupo Controlo; $p = 0,003$), que é compatível com o facto de esta fazer parte do espectro da DP (Tabela 3). As diferenças entre as comorbilidades dos dois grupos podem também ser explicadas pelo facto do grupo de doentes de Parkinson apresentar uma média de idades superior, além de ser uma população com a clínica muito bem caracterizada devido ao seguimento médico regular nas consultas de Neurologia.

De acordo com as *guidelines* do NICE, o diagnóstico da DP deve ser feito de acordo com os critérios do UKPDSBBC: presença de bradicinesia, acompanhada de pelo menos um dos outros sinais cardinais, a rigidez, o tremor de repouso e a instabilidade postural (28). No que respeita aos sintomas inaugurais, o tremor está descrito como o mais frequente, seguido pela rigidez (44). O tremor, sintoma motor principal da tríade característica da doença, surge como sintoma inicial em 71 % dos doentes (31 e 45). No nosso estudo, o grupo de doentes de Parkinson apresentou uma distribuição de sintomas inaugurais semelhante à descrita na literatura, com o tremor presente em 88% dos doentes à altura do diagnóstico, seguido pela rigidez presente em 16% dos indivíduos (Tabela 4). Contudo, a DP é já reconhecida como uma complexa entidade com um amplo espectro sintomatológico, que inclui manifestações neurológicas não motoras e neuropsiquiátricas (46-50), o que vai de encontro aos nossos resultados. No nosso grupo de doentes de Parkinson, 56 % apresentavam sintomas neuropsiquiátricos (*versus* 15,4 % do grupo Controlo -Tabela 3), sendo os sintomas não motores mais prevalentes deste grupo as alterações de humor (68 %), alterações do sono (48 %) e obstipação (36 %) (Tabela 4).

No momento do recrutamento dos indivíduos DP, estes apresentavam, em média, um tempo de evolução da doença de cerca de 6,8 anos. Verificou-se que a rigidez era o sintoma mais prevalente nessa altura, presente em 88 % dos indivíduos (Tabela 4). Isto pode dever-se, por um lado, ao facto de a rigidez ser um sintoma no qual as terapêuticas atuais pouco conseguem interferir; além disso, o tremor é o sintoma mais sujeito a melhoria subjetiva com tratamento, uma vez que é o sintoma que mais facilmente é detetado pelo próprio doente ou por terceiros e que, habitualmente, leva à procura de ajuda especializada. Contudo, 66 % dos indivíduos do grupo de doentes de Parkinson (Tabela 4) ainda apresentavam tremor aquando da sua avaliação.

Apesar da etiologia da DP ser ainda desconhecida, a sua fisiopatologia já foi bem explorada. Diversos estudos apontam para um envolvimento das glândulas salivares (20-22), pelo que podemos admitir uma possível interferência nos seus produtos de excreção. Essa evidência confere à saliva um enorme potencial no diagnóstico da DP. Várias técnicas podem ser utilizadas na análise da composição da saliva. Dentro dessas técnicas, a análise do perfil metabolómico deste e outros fluidos biológicos tem-se revelado promissora no diagnóstico e análise da progressão de diversas patologias, permitindo detetar alterações em vias metabólicas diversas associadas a essas doenças. O perfil metabolómico desses fluidos tem sido particularmente estudado utilizando técnicas como a espectrometria de massa, cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC - do inglês *high performance liquid chromatography*) e a RMN. A RMN apresenta diversas vantagens relativamente às outras técnicas de análise, pois é um método que implica o mínimo manuseamento da amostra, é de fácil análise quantitativa, robusto, versátil e reprodutível (23). Diversos estudos promissores têm utilizado a saliva para estudo de padrões de metabolitos em várias doenças (24-26) permitindo um diagnóstico mais eficaz. O nosso estudo é inédito na medida em que aplica esse método à DP, averiguando a existência de um padrão de metabolitos na saliva que possa ser característico desta doença.

Aplicando a AEM aos vários espectros de RMN de saliva da nossa amostra e com a análise discriminativa sPLS-DA entre os grupos de doentes de Parkinson e Controlo, verificou-se que existe um padrão de metabolitos distinto entre os 2 grupos, composto pelo I Etanol, II Butirato e Malonato. Observámos ainda que, o aumento de uma unidade de área, em milhões, do metabolito Etanol e Butirato aumenta a probabilidade de um individuo ter DP em, aproximadamente, 72 % e 57 % respetivamente. Enquanto que o aumento de uma unidade de área, em milhões, para o metabolito Malonato reduz em cerca de 65 % a probabilidade de ter DP.

Na análise discriminativa sPLS-DA referente ao sexo, observámos que o padrão de metabolitos é distinto: para o sexo masculino os metabolitos mais relevantes foram o I Etanol, o Propionato e o Malonato e para o sexo feminino foram os metabolitos Óxido de trimetilamina e Formato. É preciso contextualizar estas diferenças entre género no facto de as mulheres estarem sob o efeito neuroprotetor dos estrogénios (42), na idade em que a neurodegeneração dopaminérgica tem início. A diferença biológica entre sexos tem, também, grande influência

no perfil metabolómico de diversos fluidos biológicos, nomeadamente a saliva, pelo que deverá ter em conta esta influência (43).

Para a análise discriminativa sPLS-DA entre os diferentes estádios da EH&Ym do grupo de doentes de Parkinson foi necessário dividir a amostra em subgrupos maiores para se conseguir um razoável poder discriminatório. Assim, obtivemos 3 subgrupos: o subgrupo I (estádios EH&Ym 1 e 1,5), subgrupo II (estádios EH&Ym 2 e 2,5) e subgrupo III (estádios EH&Ym 3 e 4). Ainda assim, houve dificuldade em discriminar os indivíduos nos estádios mais precoces da DP, isto é, subgrupos I e II, dos indivíduos do grupo Controlo. Para os doentes de Parkinson num estágio mais avançado da doença (subgrupo III) verifica-se uma melhor discriminação relativamente ao grupo Controlo; o metabolito mais importante nesta discriminação foi o Etanol, permitindo a classificação correta no respetivo grupo em cerca de 67 % dos indivíduos.

De todos os metabolitos identificados no nosso estudo, Etanol, Butirato, Malonato, Óxido de trimetilamina e Formato, foi o Etanol que apresentou o maior potencial. Este permitiu a discriminação entre os grupos de doentes de Parkinson e Controlo, na análise de toda a amostra e na análise para o sexo masculino, além de que permitiu discriminar os doentes de Parkinson de acordo com os subgrupos I, II e III.

O nosso estudo apresenta algumas limitações, nomeadamente no que respeita ao pequeno tamanho da amostra e à grande dificuldade no recrutamento de indivíduos, pelo facto de este ser conduzido em meio hospitalar, onde a maioria dos indivíduos apresenta inúmeros sinais e sintomas incluídos nos nossos critérios de exclusão. Outra limitação importante, prende-se ao facto de a nossa amostra apresentar diversas comorbilidades, criando vieses que não conseguimos controlar a menos que a amostra do estudo seja aumentada de forma a dividir os grupos em subgrupos. Em ambos os grupos do nosso estudo há grande prevalência de doenças sistémicas que podem influenciar os nossos resultados, nomeadamente HTA (56,0 % no grupo de doentes de Parkinson e 61,5 % no grupo Controlo), doença musculoesquelética (40,0 % nos doentes de Parkinson e 61,5 % no Controlo) e doença metabólica (36,0 % nos doentes de Parkinson e 69,2 % no Controlo).

Outra limitação importante respeitante aos doentes de Parkinson, deve-se ao facto de estes estarem medicados para a doença, uma vez que o ideal seria analisar a saliva na altura do diagnóstico (subgrupo I), antes do início da medicação.

O acondicionamento das amostras de saliva requer um controlo apertado, na medida em que estas se mostraram instáveis mais de 3 horas à temperatura ambiente, pelo que deve proceder-se ao seu congelamento ou análise imediatos.

É importante ressaltar ainda que o padrão de metabolitos em todos os fluidos biológicos é influenciado quer por fatores não modificáveis como idade, sexo, raça e condições de saúde preexistentes, como por fatores modificáveis, nomeadamente dieta, ambiente e atividade física, fatores que devem ser tidos em conta na interpretação de resultados.

Outro fator limitante do nosso estudo está relacionado com o método: além do custo elevado de manutenção dos espectrómetros de RMN utilizados na aquisição dos espectros, a sua interpretação é também relativamente demorada numa fase precoce da investigação, que

posteriormente ultrapassada com o melhor conhecimento do tipo de amostra (saliva) e da análise a aplicar.

A análise sPLS-DA pode também estar sujeita a vieses. Através desta análise são indicadas as áreas das diferentes regiões do espectro de RMN de ^1H que se apresentam diferentes entre o grupo de doentes de Parkinson e o grupo Controlo. Contudo, na interpretação dos resultados dever-se-á ter em conta o facto de a seleção dessas áreas poder sofrer interferência de zonas onde a linha de base se encontra alterada, não se traduzindo em variações de quaisquer metabolitos, apesar de a AEM indicar uma alteração significativa naquela região espectral. A análise cuidadosa das zonas espectrais mais relevantes para a discriminação dos grupos deve ser feita após a AEM.

No nosso estudo apenas foi possível identificar alguns dos metabolitos detetados já presentes na HMDB (34-36). Nos casos em que não foi possível a identificação dos metabolitos, o seu estudo deverá ser complementado, posteriormente, por RMN bidimensional e, se necessário, por espectrometria de massa.

Apesar das suas limitações, o nosso estudo é bastante promissor, na medida em que utiliza um método não invasivo, com poucas limitações éticas, rápido, robusto e facilmente reproduzível. Os metabolitos identificados permitirão identificar vias metabólicas provavelmente afetadas, permitindo um melhor conhecimento da doença de modo a que, no futuro, se possa interferir de forma a atrasar ou parar a neurodegeneração a ela associada.

Em suma, este é um estudo inicial bastante promissor, uma vez que a DP continua a ser uma doença de diagnóstico estritamente clínico, num momento em que as alterações neurodegenerativas são já irreversíveis. Contudo, a história natural da DP apresenta uma fase pré-clínica (11), assintomática, na qual já estão presentes as alterações fisiopatológicas. É nessa fase que poderemos intervir de forma a prevenir ou travar a progressão da DP se existir um biomarcador que permita o diagnóstico precoce ou a identificação de indivíduos de alto risco. A metodologia utilizada no nosso estudo, a utilização da RMN na análise do perfil metabólico da saliva, deixa terreno para que, no futuro, se possam identificar possíveis biomarcadores através dos metabolitos identificados.

Bibliografia

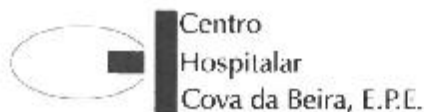
1. Parkinson J. An Essay on the Shaking Palsy. *The Journal of neuropsychiatry and clinical neurosciences*. 1817;14(2):223-236.
2. Pringsheim T, Jette N, Frolkis A, Steeves T. The prevalence of Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis. *Movement disorders*. 2014;29(13):1583-1590.
3. Jankovic J. Etiology and pathogenesis of Parkinson disease. In: UpToDate, Post TW (Ed), UpToDate, Waltham, MA (acedido em novembro de 2016).
4. Pakkenberg B, Moller A, Gundersen H, Mouritzen Dam A, Pakkenberg H. The absolute number of nerve cells in substantia nigra in normal subjects and in patients with Parkinson's disease estimated with an unbiased stereological method. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*. 1991;54(1):30-33.
5. Jankovic J, Sherer T. The Future of Research in Parkinson Disease. *JAMA Neurology*. 2014;71(11):1351.
6. Savitt J. Diagnosis and treatment of Parkinson disease: molecules to medicine. *Journal of Clinical Investigation*. 2006;116(7):1744-1754.
7. Burke W, Lang A. The progression of Parkinson disease: a hypothesis. *Neurology*. 2007;69(7):710-711.
8. Atkin G, Paulson H. Ubiquitin pathways in neurodegenerative disease. *Frontiers in Molecular Neuroscience*. 2014;7.
9. Braak H, Tredici K, Rüb U, de Vos R, Jansen Steur E, Braak E. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiology of Aging*. 2003;24(2):197-211.
10. Probst A, Bloch A, Tolnay M. New insights into the pathology of Parkinson's disease: does the peripheral autonomic system become central? *European Journal of Neurology*. 2008;15(s1):1-4.
11. Wu Y, Le W, Jankovic J. Preclinical Biomarkers of Parkinson Disease. *Archives of Neurology*. 2011;68(1): 22-30.
12. Noyce A, Lees A, Schrag A. The prediagnostic phase of Parkinson's disease. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*. 2016;87(8):871-878.
13. Ahmed S, Santosh W, Kumar S, Christlet H. Metabolic profiling of Parkinson's disease: evidence of biomarker from gene expression analysis and rapid neural network detection. *Journal of Biomedical Science*. 2009;16(1):63.
14. Luan H, Liu L, Meng N, Tang Z, Chua K, Chen L et al. LC-MS-Based Urinary Metabolite Signatures in Idiopathic Parkinson's Disease. *Journal of Proteome Research*. 2015;14(1):467-478.
15. Öhman A, Forsgren L. NMR metabonomics of cerebrospinal fluid distinguishes between Parkinson's disease and controls. *Neuroscience Letters*. 2015; 594:36-39.
16. Edgar W. Saliva: its secretion, composition and functions. *British Dental Journal*. 1992;172(8):305-312.

17. Nicaretta D, de Rosso A, Maliska C, Costa M. Scintigraphic analysis of the parotid glands in patients with sialorrhea and Parkinson's disease. *Parkinsonism & Related Disorders*. 2008;14(4):338-341.
18. Nóbrega A, Rodrigues B, Torres A, Scarpel R, Neves C, Melo A. Is drooling secondary to a swallowing disorder in patients with Parkinson's disease? *Parkinsonism & Related Disorders*. 2008;14(3):243-245.
19. Kalf J, Munneke M, van den Engel-Hoek L, de Swart B, Borm G, Bloem B et al. Pathophysiology of diurnal drooling in Parkinson's disease. *Movement Disorders*. 2011;26(9):1670-1676.
20. Masters J, Noyce A, Warner T, Giovannoni G, Proctor G. Elevated salivary protein in Parkinson's disease and salivary DJ-1 as a potential marker of disease severity. *Parkinsonism & Related Disorders*. 2015;21(10):1251-1255.
21. Al-Nimer M, Mshatat S, Abdulla H. Saliva α -synuclein and a high extinction coefficient protein: A novel approach in assessment biomarkers of Parkinson's disease. *North American Journal of Medical Sciences*. 2014;6(12):633-637.
22. Adler C, Dugger B, Hinni M, Lott D, Driver-Dunckley E, Hidalgo J et al. Submandibular gland needle biopsy for the diagnosis of Parkinson disease. *Neurology*. 2014;82(10):858-864.
23. Gebregiworgis T, Powers R. Application of NMR Metabolomics to Search for Human Disease Biomarkers. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*. 2012;15(8):595-610.
24. Duchemann B, Triba M, Guez D, Rzeznik M, Savarin P, Nunes H et al. Nuclear magnetic resonance spectroscopic analysis of salivary metabolome in sarcoidosis, vasculitis, and diffuse lung disease. 2016;33(1):10-16.
25. de Oliveira L, Martins C, Fidalgo T, Freitas-Fernandes L, de Oliveira Torres R, Soares A et al. Salivary Metabolite Fingerprint of Type 1 Diabetes in Young Children. *Journal of Proteome Research*. 2016;15(8):2491-2499.
26. Yilmaz A, Geddes T, Han B, Bahado-Singh R, Wilson G, Imam K et al. Diagnostic Biomarkers of Alzheimer's Disease as Identified in Saliva using ^1H NMR-Based Metabolomics. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2017:1-5.
27. Gelb D, Oliver E, Gilman S. Diagnostic Criteria for Parkinson Disease. *Archives of Neurology*. 1999;56(1):33.
28. Hughes A, Daniel S, Kilford L, Lees A. Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: a clinico-pathological study of 100 cases. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*. 1992;55(3):181-184.
29. Langston J, Widner H, Goetz C, Brooks D, Fahn S, Freeman T et al. Core assessment program for intracerebral transplantations (CAPIT). *Movement Disorders*. 1992;7(1):2-13.
30. Ward C, Gibb W. Research diagnostic criteria for Parkinson's disease. *Advances in neurology*. 1990; 53:245-249.
31. Goetz C, Poewe W, Rascol O, Sampaio C, Stebbins G, Counsell C et al. Movement Disorder Society Task Force report on the Hoehn and Yahr staging scale: Status and recommendations

- The Movement Disorder Society Task Force on rating scales for Parkinson's disease. *Movement Disorders*. 2004;19(9):1020-1028.
32. Levey A, Stevens L, Schmid C, Zhang Y, Castro A, Feldman H et al. A New Equation to Estimate Glomerular Filtration Rate. *Annals of Internal Medicine*. 2009;150(9):604.
 33. Silwood C, Lynch E, Claxson A, Grootveld M. ¹H and ¹³C NMR Spectroscopic Analysis of Human Saliva. *Journal of Dental Research*. 2002;81(6):422-427.
 34. Wishart DS, Tzur D, Knox C, et al., *HMDB: the Human Metabolome Database*. *Nucleic Acids Res*. 2007 Jan;35(Database issue): D521-6. 17202168
 35. Wishart DS, Knox C, Guo AC, et al., *HMDB: a knowledgebase for the human metabolome*. *Nucleic Acids Res*. 2009 37(Database issue): D603-610. 18953024
 36. Wishart DS, Jewison T, Guo AC, Wilson M, Knox C, et al., *HMDB 3.0 – The Human Metabolome Database in 2013*. *Nucleic Acids Res*. 2013. Jan 1;41(D1): D801-7. 23161693
 37. Schirra H, Ford P. NMR-Based Metabolomics of Oral Biofluids. *Methods in Molecular Biology*. 2016:79-105.
 38. Gromski P, Muhamadali H, Ellis D, Xu Y, Correa E, Turner M et al. A tutorial review: Metabolomics and partial least squares-discriminant analysis - a marriage of convenience or a shotgun wedding. *Analytica Chimica Acta*. 2015; 879:10-23.
 39. Heude C, Nath J, Carrigan J, Ludwig C. Nuclear Magnetic Resonance Strategies for Metabolic Analysis. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2017; 965:45-76.
 40. Hosmer D, Lemeshow S. *Applied logistic regression*. 2nd ed. John Wiley & Sons, Inc.; 2000.
 41. Van Den Eeden S, Tanner C, Bernstein A, Fross R, Leimpeter A, Bloch D et al. Incidence of Parkinson's disease: variation by age, gender, and race/ethnicity. *American Journal of Epidemiology*. 2003;157(11):1015-1022.
 42. Picillo M, Nicoletti A, Fetoni V, Garavaglia B, Barone P, Pellicchia M. The relevance of gender in Parkinson's disease: a review. *Journal of Neurology*. 2017 (in press).
 43. Takeda I, Stretch C, Barnaby P, Bhatnager K, Rankin K, Fu H et al. Understanding the human salivary metabolome. *NMR in Biomedicine*. 2009;22(6):577-584.
 44. Hoehn M, Yahr M. Parkinsonism: onset, progression, and mortality. *Neurology*. 1967;17(5):427-427.
 45. Ross G, Abbott R. Living and dying with Parkinson's disease. *Movement Disorders*. 2014;29(13):1571-1573.
 46. Lim S, Fox S, Lang A. Overview of the Extranigral Aspects of Parkinson Disease. *Archives of Neurology*. 2009;66(2):167-172.
 47. Barone P, Antonini A, Colosimo C, Marconi R, Morgante L, Avello T et al. The PRIAMO study: A multicenter assessment of nonmotor symptoms and their impact on quality of life in Parkinson's disease. *Movement Disorders*. 2009;24(11):1641-1649.
 48. Husl A, Seppi K, Poewe W. Nonmotor symptoms in Parkinson's disease. *Expert Review of Neurotherapeutics*. 2013;13(6):581-583.
 49. Chou K, Koeppe R, Bohnen N. Rhinorrhea: A common nondopaminergic feature of Parkinson's disease. *Movement Disorders*. 2010;26(2):320-323.

50. Fasano A, Visanji N, Liu L, Lang A, Pfeiffer R. Gastrointestinal dysfunction in Parkinson's disease. *The Lancet Neurology*. 2015;14(6):625-639.

Anexo 1 - Aprovação da Comissão de Ética do CHCB



Exma. Srª Profª Doutora
Graça Baltazar
Exma. Srª Profª Doutora
Carla Fonseca
Exma. Srª Profª Doutora
Maria Luíza Rosado

Data: 2013-06-21

Assunto: Parecer relativo ao alargamento do estudo "Identificação na saliva e sangue de possíveis biomarcadores de uma fase precoce da doença de Parkinson", aos Serviços de Urologia e Ginecologia

Exmas. Senhoras,

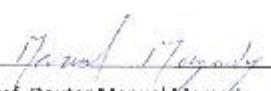
Em resposta ao V. pedido de parecer para realização do estudo supramencionado, a Comissão de Ética para a Saúde do Centro Hospitalar Cova da Beira, ao abrigo do disposto na legislação, regulamentação e procedimentos internos aplicáveis, e em sessão plenária no dia 21 de Junho de 2013, deliberou emitir parecer favorável, conforme documento em anexo.

A CES do CHCB opera dentro do exigido pelas boas práticas clínicas e pelas boas práticas epidemiológicas.

Na execução deste estudo observacional retrospectivo qualquer informação/comunicação relevante para a segurança dos participantes tem de ser imediatamente comunicada à CES do CHCB.

Com os melhores cumprimentos,

Pela Comissão de Ética para a Saúde
do Centro Hospitalar Cova da Beira



Prof. Doutor Manuel Morgado
(Vice-Presidente da CES do CHCB)

Centro Hospitalar Cova da Beira, E.P.E. - Rua da Beira, 1000-000, Cova da Beira

Sede: Quinta do Alentejo - 6200 - 251 Covilhã
Av. Adolfo Bartata - 6240 - 388 Fundão

Tel. 275 330 000
Tel. 275 330 000

Fax: 275 530 001
Fax: 275 751 057



Deliberação n.º: 32/2013	Data: 21-06-2013	Órgão: Reunião plenária
Título: "Identificação na saliva e sangue de possíveis biomarcadores de uma fase precoce da doença de Parkinson" – alargamento do estudo aos Serviços de Urologia e Ginecologia		Vossa ref.: ---- Nossa ref.: ----
Versão da documentação aprovada: Toda a constante na apresentação do estudo em 06-06-2013	Promotor: Profª Doutora Graça Baltazar Profª Doutora Carla Fonseca Profª Doutora Maria Luiza Rosado	Investigadores principais: Profª Doutora Graça Baltazar Profª Doutora Carla Fonseca Profª Doutora Maria Luiza Rosado

Membros da CES do CHCB:

Dr. António Neves da Gama
(Presidente, Médico)

Prof. Doutor Manuel Passos Morgado
(Vice-Presidente, Farmacêutico)

Enf. João José Carvalhão Ramalinho
(Enfermeiro)

Dr.ª Maria Fátima Jesus Simões
(Psicóloga)

Dr.ª Ana Paula Torgal Carreira
(Assistente Social)

Dr. Luís Manuel Carreira Fiadeiro
(Jurista)

Dr. António Luciano
(Teólogo)

A Comissão de Ética para a Saúde do Centro Hospitalar Cova da Beira, em reunião realizada na data 21/06/2013, apreciou a fundamentação do relator sobre o pedido de parecer para a realização do estudo acima referenciado.

Ouvido o relator, o processo foi votado pelos **membros da CES do CHCB presentes:**

Vice-Presidente: Prof. Doutor Manuel Augusto Passos Morgado

Drª Ana Paula Torgal Carreira

Dr. Luis Manuel Carreira Fiadeiro

Enf. João José Carvalhão Ramalinho

Resultado da votação:

Parecer favorável.

A deliberação foi aprovada por unanimidade.

Data: 21-06-2013

O Vice-Presidente da CES do CHCB:


(Prof. Doutor Manuel Morgado)

Anexo 2 - Consentimento Informado aplicado aos doentes de Parkinson e Controlos

Consentimento Livre e Informado

Graça Maria Fernandes Baltazar, Carla Sofia Pais Fonseca e Luiza Rosado, Professoras da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade da Beira Interior, a realizar um trabalho de investigação com o tema “Identificação em Fluidos Biológicos de Possíveis Biomarcadores de uma Fase Precoce da Doença de Parkinson”, vêm solicitar a sua colaboração neste estudo. Este estudo implica a consulta do processo clínico de cada paciente e a utilização de uma pequena parte da colheita de sangue realizada como rotina durante o internamento para as análises necessárias ao estudo, não sendo feita colheita sanguínea adicional propositadamente para a investigação. É ainda requerida a recolha de uma amostra de saliva. Informo que a sua participação é voluntária, podendo desistir a qualquer momento sem que por isso venha a ser prejudicado nos cuidados de saúde prestados pelo CHCB, EPE; informo ainda que todos os dados recolhidos serão confidenciais.

Consentimento Informado - Investigador

Ao assinar esta página está a confirmar o seguinte:

- * Entregou esta informação
- * Explicou o propósito deste trabalho
- * Explicou e respondeu a todas as questões e dúvidas apresentadas pelo doente.

Nome do Investigador (Legível)

(Assinatura do Investigador)

____/____/____
(Data)

Consentimento Informado - Paciente

Ao assinar esta página está a confirmar o seguinte:

- * O Sr. (a) leu e compreendeu todas as informações desta informação, e teve tempo para as ponderar;
- * Todas as suas questões foram respondidas satisfatoriamente;
- * Se não percebeu qualquer das palavras, solicitou ao investigador que lhe fosse explicado, tendo este explicado todas as dúvidas;
- * O Sr. (a) recebeu uma cópia desta informação, para a manter consigo.

Nome do Doente (Legível)

Representante Legal

(Assinatura do Doente ou Representante Legal)

____/____/____
(Data)

Anexo 3 - Questionário aplicado aos doentes de Parkinson

Início Data e Hora do questionário (saliva)

Número de processo

Nome

Idade

Género

Raça

CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Tempo desde a última refeição, bebida, lavagem de dentes e cavidade oral (Horas)

Profissões ao longo da vida:

Comorbilidades:

Medicação atual:

Medicação atual para a DP:

Desde quando toma Levodopa:

Idade à data de diagnóstico DP:

Sintomas motores inaugurais:

Exame neurológico (EN)

Realizar protocolo de exame neurológico.

EN: Reflexo pupilar direto e consensual (II, III), Movimento conjugado do olhar (II, IV, VI)

EN: Sorrir, franzir a testa, ar nas bochechas, fechar os olhos e não deixar abrir (VII)

EN: Elevação simétrica do palato, com úvula na linha média, disfonia, disartria (IX, X) e disfagia com engasgamento

EN: Prova dedo nariz ou calcanhar joelho (cerebelo) e sensibilidade proprioceptiva - Teste de Romberg

EN: Tremor, Bradicinesia, Rigidez, Instabilidade postural (pull test)

EN: Força muscular membros, distonia nos membros

EN: Reflexos ósseo-tendinosos (estiloide, bicipital, tricipital, rotuliano)

EN: Reflexo cutâneo-plantar

EN: Marcha

Escala Hoehn & Yahr modificada

- 1 - Envolvimento Unilateral
- 1.5 - Unilateral e axial
- 2 - Bilateral sem comprometimento do equilíbrio com recuperação no "pull test" (retropulsão)
- 2.5 - Doença bilateral leve com recuperação no "pull test"
- 3 - Doença bilateral leve-moderada; alguma instabilidade postural ("pull test"); fisicamente independente
- 4 - Incapacidade severa; com capacidade de marcha e equilíbrio autónoma
- 5 - Confinado a cadeira de rodas ou cama excepto com ajuda

Hora final inquérito - início de recolha da saliva

Anexo 4 - Questionário aplicado aos Controlos

Data e Hora tempo de questionário
Local de inquérito e recolha de saliva

- CHCB - Serviço Urologia
- CHCB - Serviço Ginecologia (Consulta UroGinecologia)
- CHCB - Serviço Neurologia

Médico

Número de processo

Nome

Idade

Género

Raça

CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

- Sem critérios de exclusão
- Com critérios de exclusão

Tempo desde a última refeição, bebida, lavagem de dentes e cavidade oral (Horas)

Profissões ao longo da vida

Comorbilidades

Medicação atual

Exame neurológico

Realizar protocolo de exame neurológico.

EN: Reflexo pupilar directo e consensual (II, III) e Movimento conjugado do olhar (II, IV, VI)

EN: Força do masséter (V)

EN: Sorrir, franzir a testa, ar nas bochechas, fechar os olhos e não deixar abri (VII)

EN: Elevação simétrica do palato, com úvula na linha média, disfonia, disartria (IX, X)

EN: Disfagia com engasgamento

EN: Prova dedo nariz ou calcanhar joelho (cerebelo) e Sensibilidade proprioceptiva - Teste de Romberg

EN: Tremor, Bradicinesia, Rigidez e Instabilidade postural (*pull test*)

EN: Força muscular membros e Distonia nos membros

EN: Reflexos ósseo-tendinosos (estilóide, bicipital, tricipital, rotuliano)

EN: Reflexo cutâneo-plantar

EN: Marcha

Hora final inquérito - início de recolha da saliva

Anexo 5 - Dados relativos ao grupo de doentes de Parkinson

Perfil metabólico da saliva:
potencial no diagnóstico da doença de Parkinson

Identificação	Idade	Género	Idade de início DP	Duração DP	Escala eH&Ym	Bradicepsia	Tremor	Rigidez	Instabilidade postural	Acinético rígido
DP 1	85	1	75	10	2	1	1	1		
DP 2	76	1	69	7	1			1		1
DP 3	76	0	69	7	1,5		1			
DP 4	55	1	42	13	1,5	1	1	1		
DP 6	78	1	75	10	4	1			1	
DP 7	77	1	67	3	1		1	1		
DP 8	76	0	74	2	3			1		
DP 9	73	0	58	15	3	1		1		
DP 11	64	1	62	2	1	1	1	1		
DP 12	81	0	70	11	1,5		1	1		
DP 13	70	1	68,5	1,5	2			1		
DP 14	73	0	69	4	1	1	1	1		
DP 17	76	0	68	8	1			1		
DP 18	75	1	74,3	0,7	1			1		
DP 19	79	1	75	4	1			1		
DP 20	86	0	80	6	2		1	1		
DP 21	79	1	67	12	1		1	1		
DP 22	84	0	75	9	1	1		1		
DP 23	71	1	61	10	2	1	1	1		
DP 24	63	0	54	9	2	1		1		
DP 26	80	0	73	7	4		1	1		
DP28	77	1	69	8	3	1	1	1		
DP29	72	0	71,8	2	1,5	1	1			
DP30	72	1	66	6	2	1	1	1		
DP31	77	1	72	5	2	1	1	1		

Perfil metabólico da saliva:
potencial no diagnóstico da doença de Parkinson

Identificação	Disfunção cognitiva	Alterações sensibilidade	Alterações humor	Obstipação	Psicose	Alterações do sono	Outros não motores	Bradicinesia inaugural	Tremor inaugural	Rigidez inaugural	Outros inaugurais
DP 1						1			1		
DP 2			1	1		1				1	
DP 3			1	1			1		1		
DP 4			1			1		1			
DP 6			1		1	1			1		
DP 7			1	1			1		1		
DP 8			1	1					1	1	
DP 9				1					1		
DP 11		1					1		1		
DP 12			1						1		
DP 13									1		
DP 14			1			1			1		
DP 17			1						1		
DP 18				1					1		
DP 19				1		1	1		1		
DP 20						1			1		
DP 21			1						1		
DP 22	1		1						1		
DP 23	1		1	1							1
DP 24			1						1		
DP 26			1	1		1			1		
DP 28	1		1			1		1	1	1	
DP 29		1	1			1			1		
DP 30	1	1	1			1		1	1		
DP 31		1				1			1	1	

Perfil metabólico da saliva:
potencial no diagnóstico da doença de Parkinson

Identificação	Levodopa	Dose de L-Dopa diária	Anos de L-Dopa	Agonista da dopamina	Inibidor COMT	Rasagilina	Selegilina	Anticolinérgicos	Amantadina
DP 1	1	1000	5	1	0	0	0	0	0
DP 2	1	250	4	0	0	0	0	0	0
DP 3	1	750	3	1	0	0	0	0	0
DP 4	1	1500	6	1	1	0	0	1	0
DP 6	1	650	3	1	1	1	0	0	1
DP 7	1	1000	4	0	0	1	0	0	0
DP 8	1	700	2	1	0	0	0	0	0
DP 9	1	700	5	1	0	0	0	0	0
DP 11	1	300	2	0	0	0	0	0	0
DP 12	1	725	5	1	0	0	0	0	0
DP 13	1	300	1,5	0	0	0	0	0	0
DP 14	1	300	0,2	0	0	0	1	0	0
DP 17	1	850	6	1	0	0	0	0	0
DP 18	1	50	0,7	1	1	1	0	0	0
DP 19	1	650	4	0	1	0	0	0	0
DP 20		0	0	1	0	1	0	0	0
DP 21		0	0	1	0	0	0	0	0
DP 22	1	400	4,5	0	1	0	0	1	0
DP 23	1	300	4	0	0	0	1	0	0
DP 24	1	475	9	1	0	0	0	0	0
DP 26	1	300	5	0	0	0	0	0	0
DP 28	1	300	8	1	1	0	0	0	0
DP 29	1	100	0,2	1	0	0	0	0	0
DP 30	1	400	4	1	1	1	0	0	0
DP 31	1	150	5	0	0	0	0	0	0

Perfil metabólico da saliva:
potencial no diagnóstico da doença de Parkinson

Identificação	H T A	Doenças cardio vasculares	D M 2	Doenças aparelho respiratório	Doença gastroint estinal	Doença metabó lica	Doença musculoesk uelética	DRC estád io 3	Doenç a urológi ca	Doença cerebrova scular	Neuropat ia periféric a
DP 1	1										
DP 2	1			1		1	1		1		
DP 3	1			1	1	1					
DP 4			1								
DP 6									1		
DP 7	1	1				1		1			
DP 8	1		1					1	1	1	
DP 9				1			1				
DP 11		1	1								
DP 12	1	1					1	1			
DP 13				1						1	
DP 14						1	1				
DP 17	1					1	1				1
DP 18	1							1			
DP 19	1										
DP 20	1	1	1		1			1			
DP 21	1		1	1					1		
DP 22	1		1			1	1	1			
DP 23		1					1		1		
DP 24			1				1				
DP 26	1	1				1	1	1			
DP 28		1									
DP 29	1	1		1		1		1			
DP 30											
DP 31						1	1				

Perfil metabólico da saliva:
potencial no diagnóstico da doença de Parkinson

ID	Outra medicação	Ureia (mg/dL)	Creatinina (mg/dL)	eTFG - CDK-EPI (mL/min/1,73m ²)	Ácido Úrico (mg/dL)	PCR (mg/dL)	VS (mm/H)	Hb (g/dL)	Leucócitos 10 ³ /uL
DP 1	irbesartan + hidroclorotiazida; Alprazolam, amitriptilina	59	1,10	60,9	5,9 (21-10-2013)	0,14 (<0,10)	10,00	11,60	7,40
DP 2	lisinopril, Sinvastativa, bisoprolol, Escitalopram, lorazepam, Pantoprazol	(30)	0,80	86,8	4,40	0,08 (0,04)	(2)	16,00	6,40
DP 3	Atorvastatina; Omeprazol; Domperidona; montelukaste; fexofenadina; Acetilcisteína; salbutamol	(44)	0,70	84,2	4,20	0,12	16 (14-10-2013)	13,30	6,30
DP 4	metformina+vildagliptina; Mirtazapina; Zolpidem	(26)	0,60	113,2	5,40	0,24	(23-07-2013)	15,40	7,50
DP 6	clortalidona; Lisinopril; Rosuvastativa; Pantoprazol; Varfine; trazodona; Lorazepam	34	1,20	57,6	6,00	1,43	13,00	14,40	6,80
DP 7	Brometo de tróspio; Tansulosina; ADT	22	0,60	97,0	5,00	0,13	5,00	14,70	4,20
DP 8	Lasix; valsartan; sitagliptina + metformina; insulina; rosuvastatina; trimetazidina; Clopidogrel; Pantoprazol; escitalopram; clonazepam	59	1,10	48,7	5,90	1,25		11,20	7,10
DP 9	Escitalopram; Pantoprazol; Paracetamol	57	0,50	96,0	3,60	0,02		11,70	4,20
DP 11	ADT; diosmina	48	0,60	106,3	6,50	0,18		14,80	7,30
DP 12	Anti hipertensor; clopidogrel; Rivotril; Lyrica; Sertralina	55	1,20	42,3	5,30	0,05	17,00	12,80	5,90
DP 13	Carbamazepina, fenitoína	49	0,70	95,6	3,40	0,14	7,00	13,50	8,20
DP 14	levotiroxina; Beta-histina; Lansoprazol; cloxazolam; tramadol; flupirtina; AAS	48	0,80	73,1	5,20	1,88	46,00	9,80	5,20
DP 17	Lasix; Amlodipina + Valsartan; Levotiroxina; Escitalopram; Omeprazol; Paracetamol.	27	0,90	62,1	4,80	0,22	12,00	14,20	5,40
DP 18	Lasix; Pantoprazol; flupirtina	40	1,20	58,4	4,00	0,09	6,00	14,00	4,50
DP 19	Hipotensores; Bisoprolol; Lorazepam; AAS	38	1,00	71,3	4,80	0,02	6,00	13,40	6,00
DP 20	Lasix; Losartan; Clopidogrel; mononitrato de isossorbida; digoxina; Pantoprazol; Metformina; Beta-histina; Rivotril	72	1,30	37,1	9,00	0,36	16,00	12,10	8,30
DP 21	vidagliptina + metformina; Olmesartan + Hidroclorotiazida	44	1,10	63,5	6,00	0,12	5,00	14,60	5,90
DP 22	Lasix; Enalapril; atorvastatina; metformina; Eutirox; Beta-histina; Omeprazol; Diazepam; AAS	82	1,70	27,2	6,10	0,15	52,00	10,90	5,90
DP 23	Domperidona; Amiodarona; "farmaco para a próstata";Galantamina; Pantoprazol	45	0,80	89,9	2,40	0,04	9,00	13,30	9,20
DP 24	propranolol; pentoxifilina; Glucovance; fluvoxamina; Ciprale; alprazolam	(35)	(0,5)	103	4,90		46,00	12,80	13,10
DP 26	Atorvastatina; Furosemida; Dinitrato de isossorbida;Triflusal; Ranitidina; Fluvoxamida	87	1,50	32,6	6,50	0,20	29,00	13,70	6,90
DP 28		41	0,70	91,0	4,90	0,11	13,00	14,90	5,40
DP 29		47	1,00	56,2	6,20	0,25	39,00	12,80	8,20
DP 30		35	0,70	94,3	6,70	0,16	18,00	12,70	4,80
DP 31		46	1,10	64,4	3,80	0,43	4,00	16,30	6,40

Anexo 6 - Dados relativos ao grupo Controlo

Perfil metabólico da saliva:
potencial no diagnóstico da doença de Parkinson

ID	Idade	Género	Medicação
CN 1	86	0	Furosemida; Telmisartan + Hidroclorotiazida; Pravastatina; Amlodipina; Omeprazol; Alprazolam
CN 2	61	0	Sivastatina; Inibidor bomba protões; Lorazepam; Risedronato; Paracetamol
CN 3	60	0	Metformina; anti hipertensor; Sinvastatina
CN 4	71	0	Valsartan + Hidroclorotiazida; "Tiroxina"; Ácido alendrónico + Colecalciferol; Estriol vaginal; Inibidor bomba protões
CN 5	76	1	Ramipril; Furosemida; Amlodipina; Estatina; Bicalutamida
CN 7	70	1	Lisinopril+Hidroclorotiazida; Propanolol; Sertralina; Diazepam
CNM1	71	0	Metformina; Pravastatina; Glucosamina
CNM3	70	0	Pravastatina; Losartan; Cloreto de Tróspio
CNM4	67	1	Ramipril
CNM6	82	1	Anti hipertensor; Varfine; Próstata
CNM7	79	0	Fluticasona (inalado); Montelukaste; Formoterol (inalado); Budesonida (inalado); Trifusal; Azilsartan; Rosuvastatina; Cloxazolam; Ácido Ibandrónico; Omeprazol; Terbinafina Ribomunyl
CNM9	67	1	Lansoprazol, Alprazolam, Tansulosina, Triticum, Losartan/Hidroclorotiazina, Nobivolol
CNM12	69	0	Acido ibandronico, um anti hipertensor, levotiroxina
CNM14	68	1	estatina
CNM15	59	1	Sucralfato, Bromazepam, Sinvastatina+Ezetimiba, Esoprazol, Acido Folico, Fluoxetina, Levotiroxina
CNM16	72	0	Nebivolol, Telmisartan+hidroclorotiazida, Sinvastatina
CNM17	66	1	Sinvastatina, Dabigatran , Irbesartan/Hidroclorotiazida, Fluoxetina, Dicetel
CNM19	77	1	Tansulosina, Finasterida, anti diabético oral e Anti dislipidemia
CNM20	59	0	Amlodipina/valsartan
CNM21	67	0	Budesonido+formoterol (inalação) , AAS, bilastina
CNM22	66	1	Atorvastatina, Peridopril/Amlodipina, Metformina, Rivaroxabano, Carvedilol, Pantoprazol
CNM25	61	1	Tansulosina
CNM27	75	0	Eutirox, Clopidogrel, Surmontil, Bialzegan
CNM28	61	0	Estatina
CNM29	62	0	Trepibutona (SOS)
CNM30	73	0	Enalapril/Hidroclorotiazida, Bisoprolol, 1 anti anginoso

Perfil metabólico da saliva:
potencial no diagnóstico da doença de Parkinson

ID	H T A	Doenças cardiovasculares	D M 2	Doenças aparelho respiratório	Doenças gastrointestinais	Doenças metabólicas	Doenças musculoesqueléticas	DRC estádio 3	Doença urológica
CN 1	1	1				1			
CN 2						1	1		
CN 3	1		1			1			
CN 4	1					1			
CN 5						1			1
CN 7	1							1	1
CN M1			1			1	1		
CN M3	1					1	1		
CN M4	1								
CN M6	1	1							1
CN M7	1			1		1	1		
CN M9	1	1		1					1
CN M1 2	1					1	1		
CN M1 4						1	1		1
CN M1 5						1			1
CN M1 6	1	1			1	1	1		
CN M1 7	1	1		1		1			1
CN M1 9			1			1	1		1
CN M2 0	1					1	1		
CN M2 1	1	1		1			1		
CN M2 2	1	1	1			1	1		1
CN M2 5							1		1
CN M2 7						1	1		
CN M2 8						1	1		
CN M2 9					1		1		
CN M3 0	1	1			1		1		

Perfil metabólico da saliva:
potencial no diagnóstico da doença de Parkinson

ID	Doença urológica	Fumador	Doença Psiquiátrica	Neuropatia central	Ureia (mg/dL)	Creatinina (mg/dL)	TFGe - CKD-EPI (mL/ min/ 1,73m ²)	Ácido úrico (mg/dL)	PCR (mg/dL)	VS (mm/H)	Leucócitos (10 ³ uL)
CN 1		0			43	0,8	69,6	5,4	0,27	14	8,3
CN 2		0	1		-	0,5	104,5	3,1	0,03	7	6,0
CN 3		0			34	0,7	94,2	4,5	0,78	33	7,4
CN 4		0			46	0,9	64,3	5,0	0,20	9	7,4
CN 5	1	0			54	1,1	64,9	6,1	0,70	13	6,2
CN 7	1	0	1		49	1,3	55,3	7,0	0,05	7	5,7
CN M1		0			52	0,52	96,1	4,6	0,16	12,0	6,3
CN M3		0	1		44	0,77	78,2	4,2	0,09	13,0	4,8
CN M4		0			58	0,84	90,6	5,8	0,06	11,0	5,9
CN M6	1	0			43	0,8	83,2	4,2	0,06	4,0	7,2
CN M7		0			41	0,69	82,8		0,06	17,0	5,9
CN M9	1	0	1		35	0,86	89,7	6,9	0,23	11,0	4,2
CN M1 2		0			49	0,8	75,2	4,1	0,33	21,0	8,6
CN M1 4	1	0			32	0,96	86,2	3,6	0,18	13,0	6,4
CN M1 5	1	0			30	0,75	94,3	5,2	0,08	2,0	6,8
CN M1 6		0			31	0,69	87	6,7	0,07	14,0	4,2
CN M1 7	1	0			32	0,93	85,2	5,6	0,07	1,0	7,4
CN M1 9	1	0			49	0,78	87,1	5,1	0,06	4,0	6,1
CN M2 0		0			20	0,51	105,2	3,6	0,18	6,0	6,0
CN M2 1		0		1	37	0,76	81,2	3,8	1,01	17,0	6,0
CN M2 2	1	0			51	0,96	78,4	5,2	0,40	5,0	8,3
CN M2 5	1	0			31	0,77	102,7	6,7	0,09	5,0	8,4
CN M2 7		0			26	0,67	86	4,9	0,65	29,0	4,3
CN M2 8		0			29	0,67	94,9	3,3	0,06	16,0	5,6
CN M2 9		0			21	0,56	99,9	4,0	0,34	13,0	5,0
CN M3 0		0			35	0,72	83,1	4,6	0,57	18,0	5,0

**Anexo 7 - Loadings das 72 regiões do
espectro de RMN, componente 2, grupo
doentes de Parkinson *versus* grupo
Controlo**

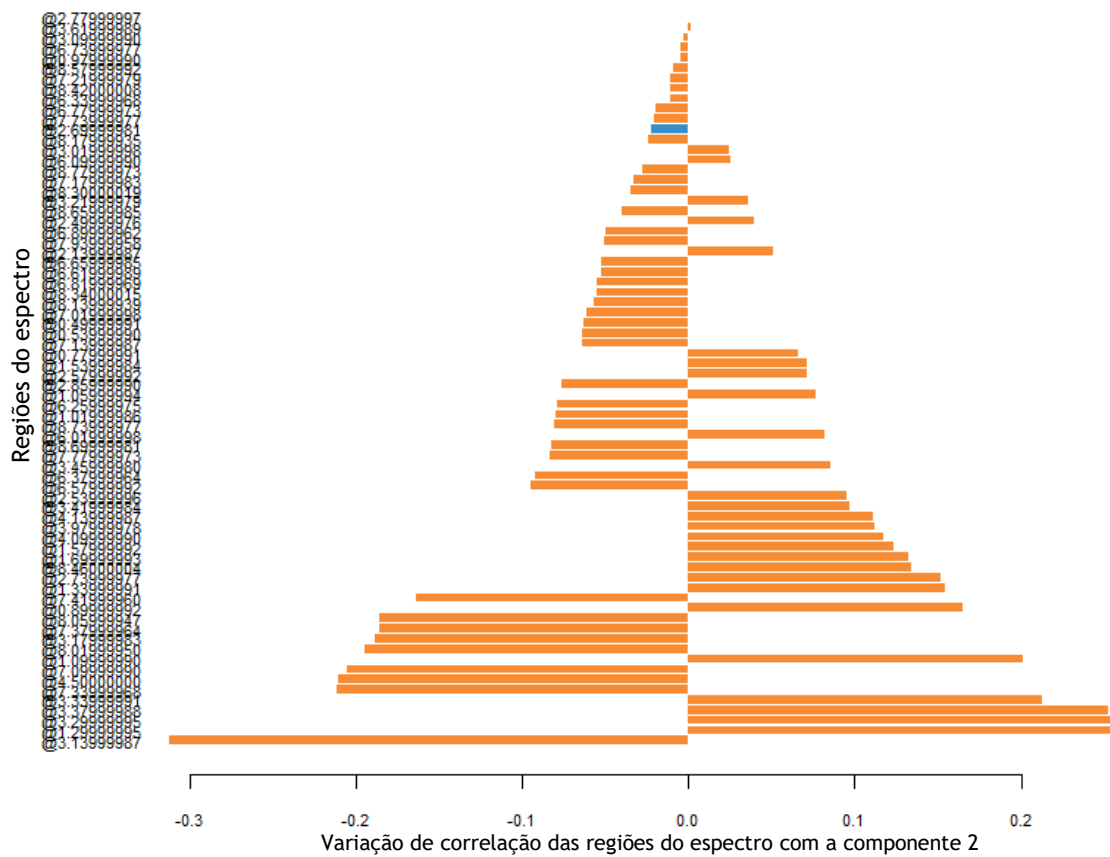


Figura 19 - Loadings das 72 regiões do espectro de RMN, que contribuem para a componente 2 na discriminação da DP, representando o sinal a direção da correlação dessa região com a componente, grupo doentes de Parkinson versus grupo Controlo.

Anexo 8 - Metabolitos identificados e sua representação no espectro de RMN

Tabela 25 - Metabolitos identificados nas amostras de saliva, através análise de espetros de RMN de ^1H , unidimensionais (Anexo 8 - Figuras 18, 19 e 20), e espetros bidimensionais J-resolved, assim como da consulta da base de dados HMDB (34-36). Nome do metabolito e respetivos desvios químicos e a multiplicidade dos sinais, e em que análise discriminativa foram utilizados.

Localização	Metabolito	Desvio químico (ppm)	Multiplicidade dos sinais
1	Formato	8,44	Singleto
2	Ureia	5,78	Singleto
6e; 4a	Lactato	1,32; 4,10	Dupleto; quarteto
6b; 4b	Etanol	1,17; 3,65	Tripleto; quarteto
4c	Malonato	3,11	Singleto
4d	Óxido de trimetilamina	3,25	Singleto
4e; 4f	Taurina	3,25; 3,42	Tripleto; tripleto
4g	Glicina	3,56	Singleto
4h	Metanol	3,34	Singleto
5a; 6c; 6d	Butirato	2,14; 1,55; 0,88	Tripleto; Multipleteo (6); tripleto
5b	Metilamina	2,59	Singleto
6a; 5c	Propionato	1,04; 2,17	tripleto; quarteto
5d	Sucinato	2,39	singleto
5e	Acetato	1,91	singleto
5f	Trimetilamina	2,89	singleto

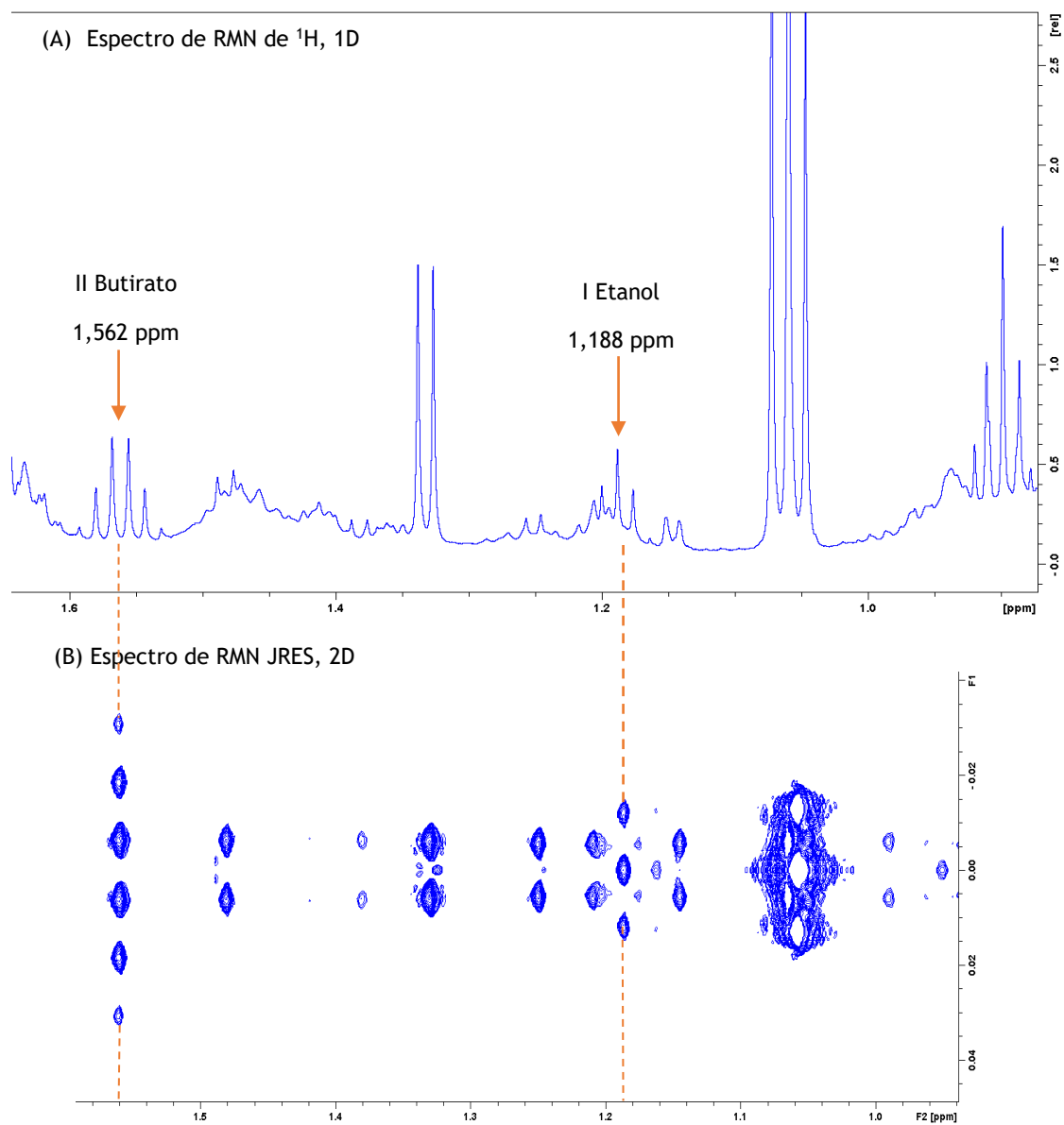


Figura 20 - Espectro de RMN de ^1H , 1D (A) e espectro de RMN JRES, 2D (B), com metabólitos identificados, II Butirato e I Etanol, referidos no Anexo 8 - Tabela 25.

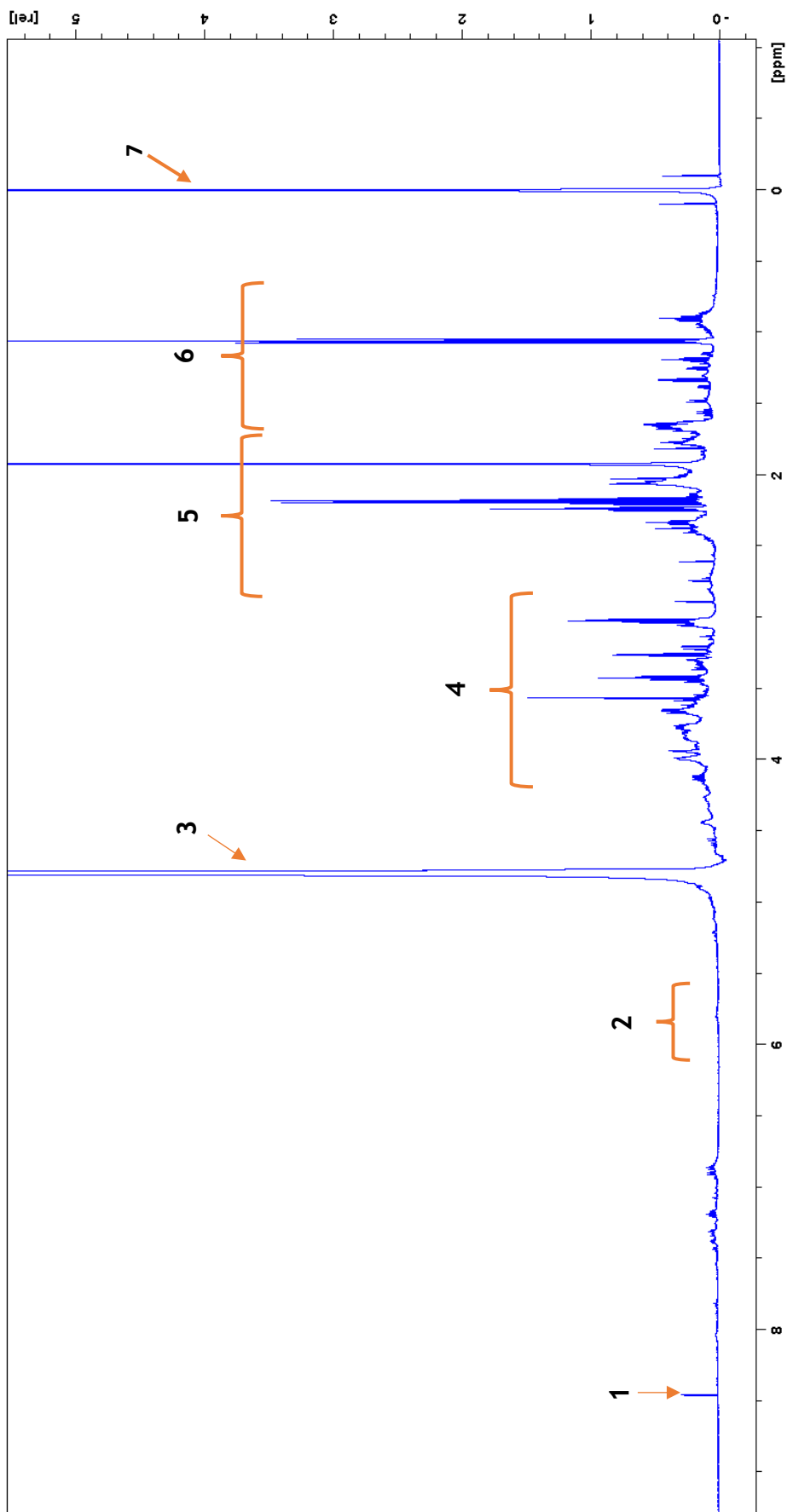


Figura 21 - Espectro de RMN de ^1H de uma amostra de saliva de controlo, com os metabolitos identificados por números, que se encontram na Anexo 8 - Tabela 25, sendo 1 o formato, 2 a ureia, 3 a água, 7 o TSP e as regiões identificadas encontram-se expandidas na Figura 22.

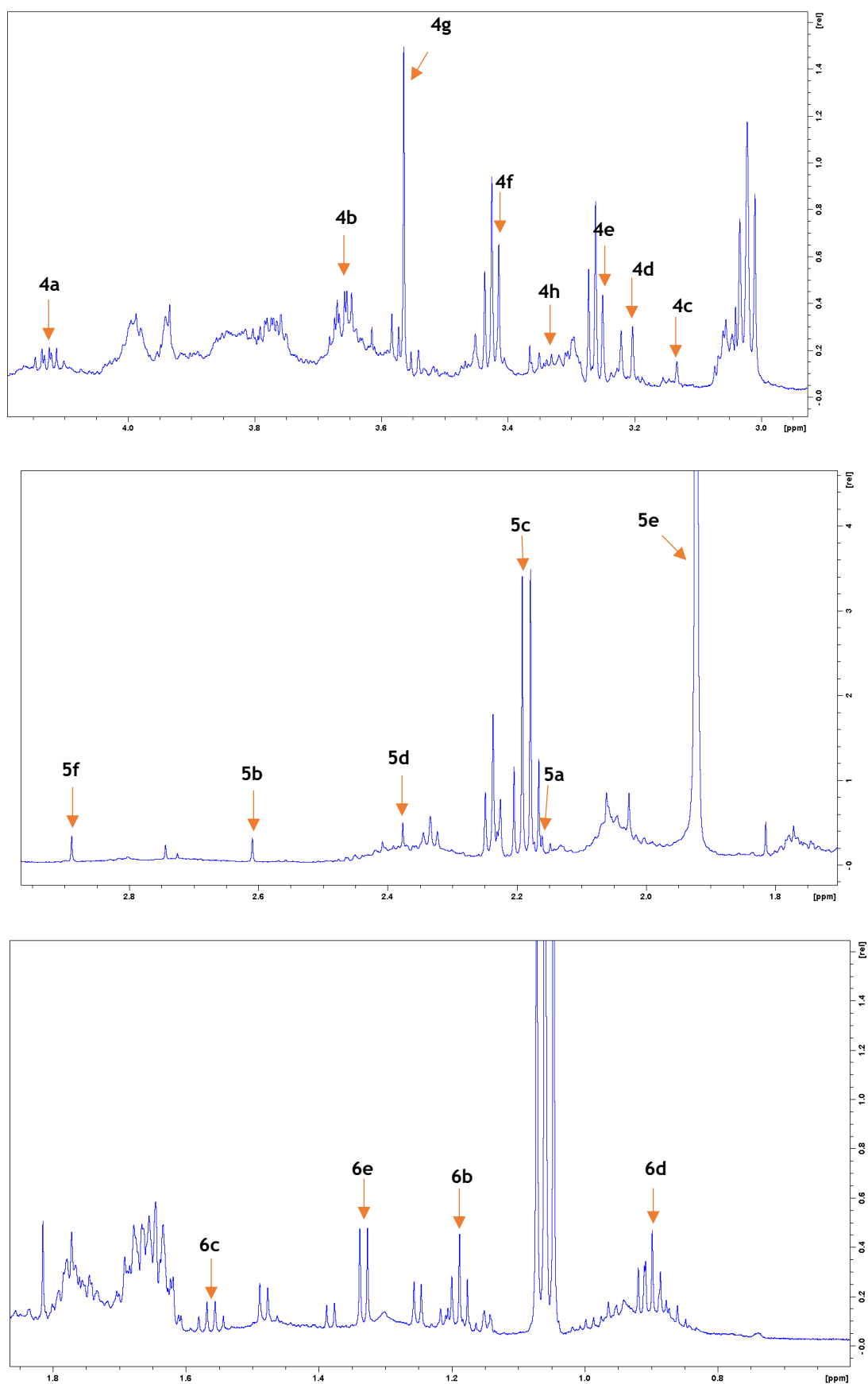


Figura 22 - Espectro de RMN de ¹H fracionado da Figura 20, de uma amostra de saliva controlo com os metabolitos identificados por número/letra, referidos no Anexo 8 -Tabela 25.