



O Envolvimento de Proteínas Salivares na Sensibilidade Gustativa

Lénia Isabel Alfaiate Rodrigues

Tese apresentada à Universidade de Évora
para obtenção do Grau de Doutor em Bioquímica

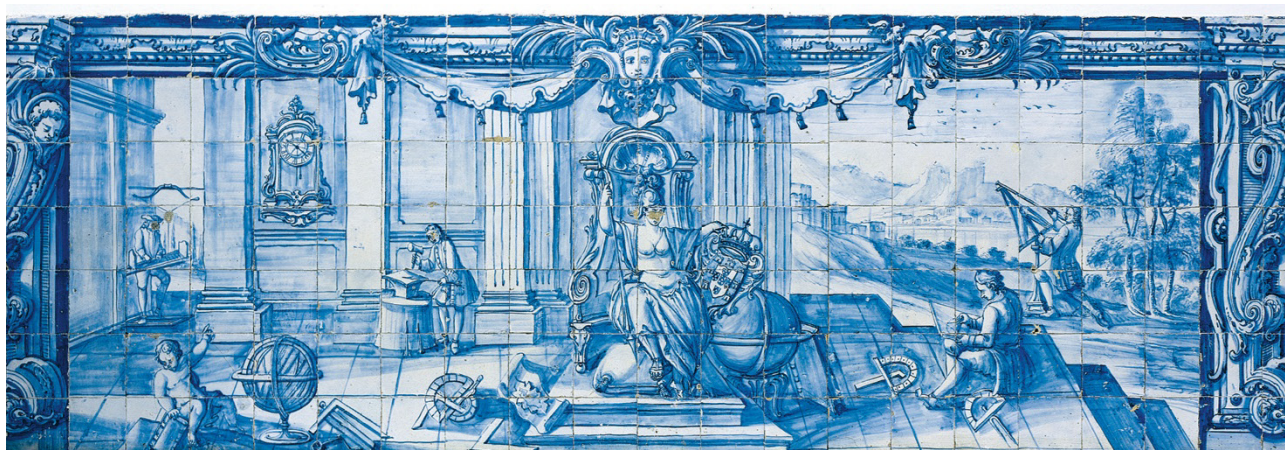
ORIENTADORES:

Elsa Cristina Carona de Sousa Lamy

Francisco Manuel Lemos Amado

Cristina Maria dos Santos Conceição Pinheiro

ÉVORA, JULHO DE 2017



Aos meus pais, avó, namorado e, especialmente, ao meu avô

Agradecimentos

Quero expressar um agradecimento muito especial aos meus orientadores, a Doutora Elsa Lamy, o professor Francisco Amado e a professora Cristina Pinheiro. Obrigada pelo apoio, sugestões, ensinamentos, pela disponibilidade e dedicação que sempre demonstraram em orientar esta dissertação. Não posso deixar de agradecer especialmente à Doutora Elsa Lamy. Foram quatro anos intensos, de muito trabalho, com alguns contratemplos e decisões difíceis de tomar. Obrigada por estar sempre presente, pela paciência e pela dedicação. Sem você dificilmente este trabalho se teria realizado.

Gostava de agradecer ao professor Doutor Carlos Cordeiro e Doutor Gonçalo Costa, da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, pela disponibilidade, ensinamentos e ajuda sempre que precisei de fazer as identificações proteicas.

Ao Professor Doutor Fernando Capela e Silva por todo o apoio, incentivo, compreensão e ajuda. Acima de tudo obrigada por me continuar a acompanhar nesta jornada e a estimular o meu interesse pelo conhecimento.

Deixo um agradecimento muito especial à minha colega e amiga Raquel Ferro, com quem tenho vindo a partilhar as alegrias e tristezas desde o início desta jornada. Obrigada pelo apoio, amizade, incentivo, ideias e, acima de tudo, pelo ânimo nos dias em que nada parece dar certo. Sabes o quanto és importante para mim! Espero ter-te sempre na minha vida.

Agradeço também à Graça Machado por toda a ajuda quando mais precisei, pela amizade, pelos conselhos, pela disponibilidade. Muito obrigada por tudo! Quero deixar também o meu obrigado à Elsa Caeiro pela companhia, incentivo e boa disposição nas horas de almoço.

Gostava também de agradecer à professora Rosarinho por toda a ajuda e disponibilidade que sempre demonstrou! Obrigada por nos ajudar incansavelmente! Agradeço também à professora Ana Elisa, ao professor Augusto Peixe e à enfermeira Rosa pela partilha e disponibilidade sempre que precisei.

A todas as minhas colegas de laboratório que ao longo dos anos me fizeram companhia e me ajudaram, muito obrigado! Agradeço também à minha colega de laboratório Sónia Lucena, pela companhia, boa disposição e ajuda!

Quero agradecer às minhas “vizinhas” de laboratório, Joana e Sara, pela companhia naqueles dias que parecem não terminar, pela boa disposição, por me incentivarem quando eu mais precisei. Espero continuar a trabalhar ao vosso lado durante muito tempo!

Quero deixar um agradecimento especial à Dona Felicidade, que é a minha primeira companhia todas as manhãs na Mitra! Obrigada pelo carinho e por me tratar sempre tão bem! Às técnicas Virgínia Sobral, Margarida Romão e engenheira Francisca Figo, obrigada pela disponibilidade que sempre demonstraram quando precisei de ajuda.

Obrigada às colegas Isabel Velada, Catarina e Hélia Cardoso pela ajuda e disponibilidade sempre que precisei.

Não posso deixar de agradecer também ao Mário Brás e à minha colega Mara Silva por toda a ajuda técnica e paciência nesta fase final.

Obrigada à minha querida amiga Raquel Mouta pelo carinho e amizade.

Quero deixar um agradecimento muito especial a todos os voluntários que participaram neste estudo, tanto adultos como crianças. Sem eles nada disto seria possível!

Por último, mas não menos importante, agradeço à minha família, em especial aos meus pais, avó e namorado por estarem sempre presentes, pela compreensão, paciência, apoio, ânimo, carinho e amor quando mais precisava. A eles devo a pessoa que sou hoje. Clemente obrigada pela paciência, por seres meu amigo, meu amor, meu tudo. Avô, quem me dera que estivesse aqui! Obrigada por tudo o que me ensinou...sei que está orgulhoso!

Resumo

A variabilidade na sensibilidade gustativa é considerada relevante na aceitação dos alimentos e desenvolvimento de doenças associadas ao comportamento alimentar. Os gostos doce e amargo induzem, respetivamente, aceitação ou aversão inatas. Apesar da contribuição genética, esta não explica completamente as diferenças inter-individuais e sendo a saliva o principal constituinte do ambiente exterior das células recetoras do gosto, contactando diretamente com os alimentos, a sua composição poderá condicionar a perceção gustativa. O objetivo geral deste trabalho foi avaliar a relação entre a composição salivar e a sensibilidade para os gostos doce e amargo.

A componente prática dividiu-se em dois ensaios, um com jovens adultos e outro com crianças, em que foram realizados testes sensoriais, recolhas de saliva e avaliações antropométricas. Nas crianças foram ainda avaliadas preferências alimentares. O maior enfoque dado à saliva foi relativamente à composição proteica, avaliada com recurso a técnicas de separação, identificação e imunomarcção. Contudo, parâmetros como cortisol e leptina salivares foram também avaliados dado o seu possível envolvimento na perceção oral e relação com Índice de Massa Corporal (IMC).

A relação entre proteínas salivares (ex. cistatinas, α -amilase, proteína indutora de prolactina) e sensibilidade foi observada para ambos os gostos, mas de forma diferente para cada um deles. Também foi observada a influência do sexo e IMC na relação entre saliva e gosto. Algumas diferenças poder-se-ão dever à contribuição diferente das diferentes glândulas salivares para o total da saliva, que também poderá diferir entre normoponderais e excesso de peso. Tendo-se confirmado, no presente estudo, que a sensibilidade gustativa se relaciona com as preferências e uma vez que os resultados sugerem que a mesma pode ser moldada por condições hormonais (ex. leptina) e/ou estados emocionais (ex. cortisol), é de realçar a relevância que o conhecimento do meio oral pode ter na compreensão da aceitação e escolhas alimentares.

Palavras-chave: Sensibilidade gustativa; proteoma salivar; doce; amargo

Abstract

The Involvement of Salivary Proteins in Taste Sensitivity

The variability in taste sensitivity is relevant for the acceptance of food and for the development of diseases associated with eating behaviour. Sweet and bitter tastes induce, respectively, innate aversion or acceptance. Despite the genetic contribution, this does not fully explain the inter-individual differences. Being saliva the main constituent of the external environment of taste cells, directly contacting with food, its composition can influence gustatory perception. The general objective of this study was to evaluate the relationship between saliva composition and the sensitivity to sweet and bitter tastes.

The experimental part was divided into two trials, one with young adults and other with children, in which sensory tests, saliva collections and anthropometric evaluation were performed. In children food preferences were also evaluated. The major focus of saliva was on the protein composition, evaluated using techniques of separation, identification and immunostaining. However, parameters like salivary cortisol and leptin were also evaluated given their possible involvement in oral perception and relation with Body Mass Index (BMI).

The relationship between salivary proteins (e.g. cystatins, α -amylase, prolactin-inducing protein) and sensitivity was observed for both tastes, but differently for each of them. The influence of sex and BMI on the relationship between saliva and taste was also observed. Some differences may be due to the different contribution of different salivary glands to total saliva, which may also differ between normoponderal and overweight. In the present study, it was confirmed that taste sensitivity is related to preferences and, since the results suggest that it can be shaped by hormonal conditions (e.g. leptin) and/or emotional states (e.g. cortisol), it is important to emphasize the relevance that the knowledge about the characteristics of the oral environment can have in the understanding of acceptance and food choices.

Keywords: Taste sensitivity; salivary proteome; sweet; bitter

I- Índice geral

Agradecimentos	iii
Resumo	v
Abstract	vii
Índice geral	ix
Lista de Figuras	xiii
Lista de Tabelas	xix
Lista de abreviaturas	xxiii
Capítulo 1-Introdução geral	1
1.1- Comportamento alimentar	3
1.1.1- Fatores que influenciam o comportamento alimentar	3
1.2- Percepção oral	4
1.2.1- Sistema gustativo: Anatomia e fisiologia do gosto	6
1.2.2- Gostos básicos	10
1.2.2.1- Salgado	10
1.2.2.2- Ácido	11
1.2.2.3- Umami	12
1.2.2.4- Amargo	13
1.2.2.5- Doce	14
1.2.3- Sensibilidade gustativa: definição e teses de avaliação	16
1.2.4- Fatores que afetam a sensibilidade gustativa	19
1.2.5- Implicações de variações na sensibilidade gustativa nas escolhas alimentares e saúde	23
1.2.5.1- Relação entre índice de Massa Corporal (IMC) e sensibilidade gustativa	24
1.3- Saliva	25
1.3.1- Principais características e funções da saliva	25
1.3.2- O papel da saliva na percepção oral	29
1.3.3-Utilização da proteômica no estudo da saliva	34
1.3.3.1- Técnicas de separação proteica	36

1.3.3.2- Espectrometria de massa	39
1.3.3.3- Utilização da proteômica salivar na percepção oral e estudos sobre escolhas alimentares	41
2- Capítulo 2- Objetivos	43
3- Capítulo 3- Descrição geral da metodologia	47
4- Capítulo 4- Relação entre a composição da saliva e a resposta ao gosto amargo em adultos	51
4.1- Introdução	53
4.2- Materiais e métodos	55
4.3- Resultados	64
4.4- Discussão	92
4.5- Conclusão	101
5- Capítulo 5 - Relação entre a composição da saliva e a resposta ao gosto doce em adultos	103
5.1- Introdução	105
5.2- Materiais e métodos	107
5.3- Resultados	110
5.4- Discussão	124
5.5- Conclusão	129
6- Capítulo 6- Influência da sensibilidade gustativa nas preferências alimentares e IMC em crianças	131
6.1- Introdução	133
6.2- Materiais e métodos	135
6.3- Resultados	139
6.4- Discussão	152
6.5- Conclusão	157
7- Capítulo 7- Relação entre a composição proteica da saliva e a sensibilidade para os gostos doce e amargo em crianças	159
7.1- Introdução	161
7.2- Materiais e métodos	163
7.3- Resultados	171
7.4- Discussão	212
7.5- Conclusão	219

8- Capítulo 8- Relação entre cortisol e amilase salivar com a sensibilidade para os gostos doce e amargo em crianças	221
8.1- Introdução	223
8.2- Materiais e métodos	224
8.3- Resultados	226
8.4- Discussão	234
8.5- Conclusão	238
9- Capítulo 9 - Relação entre os níveis de leptina salivar e a sensibilidade gustativa em adultos e crianças	239
9.1- Introdução	241
9.2- Materiais e métodos	242
9.3- Resultados	244
9.4- Discussão	249
9.5- Conclusão	252
10- Capítulo 10- Discussão geral, conclusões e perspectivas futuras	253
10.1- Discussão geral	256
10.2- Conclusão geral	262
10.3- Perspetivas futuras	263
11- Referências bibliográficas	267
12- Anexos	

II- Lista de figuras

Capítulo 1

Figura 1.1- Fatores que influenciam as escolhas e comportamento alimentar	4
Figura 1.2- Localização dos diferentes tipos de papilas gustativas na língua humana	7
Figura 1.3- Representação da papila e do gomo gustativo	8
Figura 1.4- Diferentes tipos de células que constituem os gomos gustativos.	9
Figura 1.5 – Diagrama esquemático da via de transdução do gosto salgado nas células recetoras do gosto.	11
Figura 1.6 – Diagrama esquemático da via de transdução do gosto ácido nas células recetoras do gosto.	12
Figura 1.7 – Diagrama esquemático da via de transdução dos gostos umami e amargo nas células recetoras do gosto.	14
Figura 1.8 – Diagrama esquemático da via de transdução do gosto doce nas células recetoras do gosto.	15
Figura 1.9- Localização anatômica das glândulas salivares maiores.	26
Figura 1.10- Constituintes proteicos da saliva	28
Figura 1.11- Esquema representativo da ação da saliva na percepção dos alimentos. Exemplos de proteínas salivares envolvidas na função gustativa	34

Capítulo 4

Figura 4.1 – Classificação dos indivíduos consoante a resposta ao amargo (PROP).	64
Figura 4.2- Imagem representativa de perfis proteicos obtidos por separação eletroforética unidimensional (SDS-PAGE).	68
Figura 4.3 – Níveis de expressão das bandas proteicas que apresentaram diferenças significativas entre indivíduos com diferente resposta para o PROP, na saliva recolhida antes e depois do estímulo.	68
Figura 4.4 – Níveis de expressão de CA-VI (média \pm EPM) nas amostras de saliva mista recolhidas antes e depois da estimulação com PROP. [densidade ótica obtida usando uma análise densitométrica.	70

Figura 4.5 – Análise *Western Blot* para Cistatina presente nas amostras de saliva total, recolhidas antes e depois da estimulação com PROP, para diferentes grupos de capacidade de resposta para o amargo. **71**

Figura 4.6 – Imagens representativas do perfil proteico salivar bidimensional de mulheres e homens. **74**

Figura 4.7- Gráficos da relação significativa entre a expressão proteica (% volume dos spots) e o IMC em homens e mulheres. **76**

Figura 4.8- Imagem representativa do perfil proteico salivar bidimensional, com representação de spots diferencialmente expressos entre grupos de diferente e dos spots que apresentaram correlação significativa com IMC em homens e mulheres. **77**

Figura 4.9 – Imagem representativa do perfil proteico salivar bidimensional, com representação de spots diferencialmente expressos entre grupos de diferente resposta para o amargo. **84**

Figura 4.10 – Gráficos da relação significativa entre a expressão proteica (% volume dos spots) e a intensidade percebida de PROP em homens e mulheres. As diferenças são significativas para $P < 0,05$. **86**

Figura 4.11 - Imagens representativas do perfil proteico bidimensional de saliva recolhida antes e depois da estimulação com o composto amargo PROP. **90**

Capítulo 5

Figura 5.1- Gráfico da correlação significativa entre os níveis de glucose salivar e os limiares de sacarose em mulheres. **111**

Figura 5.2- Nível de expressão (% Vol.) de bandas diferencialmente expressas entre indivíduos com diferente sensibilidade para o gosto doce. **113**

Figura 5.3- Imagem representativa de perfis proteicos obtidos por separação eletroforética unidimensional (SDS-PAGE). **114**

Figura 5.4 – Atividade enzimática da α -amilase salivar (U/min) em amostras de saliva mista de homens e mulheres com diferentes níveis de sensibilidade para o doce. **115**

Figura 5.5 – Imagem representativa do perfil proteico salivar bidimensional, com representação de *spots* diferencialmente expressos entre grupos de sensibilidade gustativa para o doce. 120

Figura 5.6 - Gráficos da relação significativa entre a expressão proteica (% volume dos spots) e os limiares da sacarose (g/L) no total de indivíduos, em homens e mulheres. 122

Capítulo 6

Figura 6.1- Distribuição das crianças (tendo o sexo em consideração) pelos grupos de sensibilidade para o gosto amargo e para o gosto doce. 141

Figura 6.2 – Variações no percentil de IMC entre as diferentes posições sociais. 144

Figura 6.3 – Variações na frequência de atividade física programada entre diferentes níveis de escolaridade das mães. Letras diferentes representam diferenças entre grupos. 145

Capítulo 7

Figura 7.1- Imagem representativa de perfil proteico salivar uni-dimensional (SDS-PAGE) de rapazes e raparigas. 178

Figura 7.2- Nível de expressão da banda k, identificada como cistatina SN e cistatina S, entre crianças com diferentes limiares de deteção para a cafeína. 181

Figura 7.3- Imagem representativa de perfil unidimensional salivar (SDS-PAGE) de amostras de crianças. 183

Figura 7.4– Imagens representativas do perfil proteico salivar bidimensional de rapazes e raparigas. 188

Figura 7.5– Imagem representativa do perfil proteico salivar bidimensional, com representação de spots diferencialmente expressos entre grupos de diferente sensibilidade gustativa para o amargo (spots a vermelho) e entre grupos de sensibilidade gustativa para o doce (spots a azul). 201

Figura 7.6- Nível de expressão das diferentes isoformas de cistatina e outras proteínas presentes na banda K, entre crianças normoponderais e com excesso de peso. 203

Figura 7.7- Nível de expressão, por unidade de volume de cistatina C e cistatina S, presentes na banda K, entre crianças com diferente percentil de IMC.	204
Figura 7.8- Nível de expressão das diferentes isoformas de cistatina, presentes na banda K, entre crianças (A) normoponderais e (B) com excesso de peso com diferente sensibilidade para o gosto amargo.	206
Figura 7.9- Nível de expressão, normalizado para a concentração proteica, de cistatina SA, presente na banda K, entre crianças normoponderais com diferente sensibilidade para o gosto amargo.	207
Figura 7.10- Nível de expressão das diferentes isoformas de cistatina, presentes na banda K, entre crianças (A) normoponderais e (B) obesas com diferente sensibilidade para o gosto doce.	208
Figura 7.11- Níveis de cistatinas, por unidade de volume de saliva: comparação entre crianças normoponderais com diferente sensibilidade para o gosto doce.	208
Figura 7.12 – Níveis de cistatinas S, SA e SN presentes nas amostras de saliva mista de crianças com excesso de peso (pré-obesas + obesas), com diferentes sensibilidades para o amargo.	210
Figura 7.13 – Níveis de cistatinas S, SA e SN, por unidade de volume, presentes nas amostras de saliva mista de crianças com excesso de peso (pré-obesas + obesas), com diferentes sensibilidades para o amargo.	211

Capítulo 8

Figura 8.1- Comparação entre sexos tendo em conta os níveis de cortisol salivar, atividade enzimática de α -amilase salivar e rácio amilase/cortisol.	228
Figura 8.2 – Gráfico da correlação entre os níveis de cortisol salivar e o %IMC em rapazes.	229
Figura 8.3 - Atividade enzimática da α -amilase (média \pm EPM) em amostras de saliva total de rapazes normoponderais com diferentes níveis de sensibilidade para o gosto amargo.	230
Figura 8.4 – Gráficos da correlação entre a atividade enzimática de α -amilase salivar e os limiares do gosto amargo em rapazes normoponderais.	231

Figura 8.5- Gráfico da correlação entre o rácio amilase/cortisol e os limiares do gosto amargo para raparigas normoponderais. **232**

Figura 8.6- Gráfico da correlação entre os níveis de cortisol salivar e os limiares de doce para rapazes normoponderais. **233**

Capítulo 9

Figura 9.1- Comparação dos níveis de leptina salivar (pg/mL) entre crianças e adultos. **244**

Figura 9.2 – Comparação entre sexos dos níveis de leptina salivar (pg/mL) em crianças normoponderais e adultos normoponderais. **245**

Figura 9.3 – Comparação da concentração de leptina salivar (pg/mL) entre indivíduos normoponderais e com excesso de peso. **245**

Figura 9.4 – Relação entre limiares de deteção da sacarose e concentração de leptina salivar em crianças. **246**

Figura 9.5 – Níveis de leptina salivar em crianças e adultos sensíveis e pouco sensíveis ao gosto doce. **247**

Figura 9.6 – Comparação dos níveis de leptina salivar entre indivíduos com diferente perceção para o gosto amargo. **248**

III- Lista de tabelas

Capítulo 4

- Tabela 4.1** – Percentagem de indivíduos normoponderais e obesos pertencentes a cada grupo de capacidade de resposta para o gosto amargo. **65**
- Tabela 4.2** – Comparação de parâmetros salivares (média \pm erro padrão) nos dois períodos de recolha para cada grupo de resposta para o gosto amargo. **66**
- Tabela 4.3** – Identificação, por espectrometria de massa, das proteínas salivares diferencialmente expressas entre sexos (letra da banda a azul) e entre grupos de resposta ao PROP (letra da banda a vermelho) **69**
- Tabela 4.4**-Identificação e comparação das proteínas diferencialmente expressas entre homens e mulheres. **73**
- Tabela 4.5**- Identificação por espectrometria de massa das proteínas diferencialmente expressas entre homens normoponderais e com excesso de peso **77**
- Tabela 4.6** - Identificação por espectrometria de massa das proteínas diferencialmente expressas entre indivíduos ST e NT (saliva recolhida antes da estimulação com PROP) **80**
- Tabela 4.7**- Identificação por espectrometria de massa das proteínas diferencialmente expressas entre ST e NT antes e depois do estímulo **88**

Capítulo 5

- Tabela 5.1** – Percentagem de indivíduos normoponderais e obesos pertencentes a cada grupo de sensibilidade para o doce. **110**
- Tabela 5.2** – Comparação de parâmetros salivares (média \pm erro padrão) entre grupos de sensibilidade para o gosto doce. **112**
- Tabela 5.3**– Identificação das proteínas salivares diferencialmente expressas entre grupos de percepção gustativa, de acordo com os perfis proteicos SDS-PAGE **114**

Tabela 5.4 – Identificação e comparação da expressão de *spots* proteicos entre os grupos de sensibilidade para o gosto doce 117

Capítulo 6

Tabela 6.1- Grupos e respetivos alimentos 137

Tabela 6.2 – Características das crianças em estudos 139

Tabela 6.3- Percentagem de crianças sensíveis e pouco sensíveis pertencentes a cada grupo de sensibilidade para os gostos amargo e doce. 141

Tabela 6.4- Percentagem de crianças normoponderais, pré-obesas e obesas pertencentes a cada grupo de sensibilidade para o gosto amargo. 142

Tabela 6.5- Percentagem de crianças normoponderais, pré-obesas e obesas pertencentes a cada grupo de sensibilidade para o gosto doce. 143

Tabela 6.6 – Proporção de indivíduos (%) com elevados níveis de preferência pelos diversos alimentos avaliados. 147

Tabela 6.7 - Proporção de indivíduos (%) com elevados níveis de preferência pelos diversos alimentos avaliados de acordo com as sensibilidades para os gostos doce e amargo. 150

Capítulo 7

Tabela 7.1- Comparação da concentração proteica e taxa de secreção salivar entre crianças com diferente sensibilidade para o gosto amargo (valores representados média \pm erro padrão). 173

Tabela 7.2- Comparação da concentração proteica e taxa de secreção salivar entre crianças com diferente sensibilidade para o gosto doce (valores representados média \pm erro padrão). 175

Tabela 7.3- Relação entre os níveis de glucose salivar($\mu\text{g/ml}$) e os limiares de amargo e doce(mg/mL) tendo em conta o sexo e percentil IMC 177

Tabela 7.4 – Identificação, por espectrometria de massa, das proteínas salivares presentes em bandas diferencialmente expressas entre grupos de sensibilidade. 180

Tabela 7.5- Bandas diferencialmente expressas entre diferentes grupos de sensibilidade para o gosto amargo em crianças pré-obesas e obesas.	182
Tabela 7.6- Bandas diferencialmente expressas entre diferentes grupos de sensibilidade para o gosto doce em crianças pré-obesas e obesas.	182
Tabela 7.7 - Identificação por espectrometria de massa das proteínas diferencialmente expressas entre rapazes e raparigas	185
Tabela 7.8- Identificação por espectrometria de massa das proteínas diferencialmente expressas entre crianças normoponderais e obesas	190
Tabela 7.9- Identificação por espectrometria de massa das proteínas diferencialmente expressas entre crianças sensíveis e pouco sensíveis ao amargo	194
Tabela 7.10- Identificação por espectrometria de massa das proteínas diferencialmente expressas entre crianças sensíveis e pouco sensíveis ao doce	199
Tabela 7.11- Proteínas salivares presentes na banda K e identificadas por LC-MS/MS	204
Tabela 7.12 - Número de indivíduos em condições de análise para os níveis de expressão de cistatinas salivares	209
Tabela 7.13- Expressão de cistatinas (intensidade*área), tendo em conta o sexo e percentil IMC, entre diferentes grupos de sensibilidade para o gosto doce	211

Capítulo 8

Tabela 8.1- Resumo dos resultados obtidos para os parâmetros salivares avaliados neste capítulo	234
--	------------

IV- Lista de Abreviaturas

1-DE	Eletroforese unidimensional
2-DE	Eletroforese bidimensional
1D-LC	Cromatografia líquida unidimensional
2D-LC	Cromatografia líquida bidimensional
AC	Adenilato ciclase
ACN	Acetonitrilo
AGC	Controlo automático de ganho
Ala	Alanina
ASICs	canais iónicos sensíveis a compostos ácidos
BSA	Albumina do soro bovino
CA VI	Anidrase carbónica VI
CBB	Azul brilhante de Coomassie
CE	Eletroforese capilar
CHAPS	Propanosulfonato de 3-(3-colamidopropil) dimetilamónio
CHCA	ácido α -Ciano-4-hidroxicinamico
cAMP	Adenosina monofosfato cíclica
cGMP	Guanosina monofosfato cíclica
cNMP	Nucleosido monofosfato cíclico
DAG	Diacilglicerol
DIGE	Eletroforese em gel diferencial
DTT	Ditiotreitol
EGF	Fator de crescimento epidérmico
ENaC	Canais seletivamente permeáveis ao ião sódio
GLM	Modelo geral linear
GLP-1	Péptido 1 semelhante a glucagina
GluR4	Recetor de glutamato
GPCRs	Recetores acoplados a proteína G
HCD	Dissociação de alta energia
HPA	Hipotálamo-pituitária-adrenal
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
IEF	Focagem isoeletrica
ESI	Ionização <i>electrospray</i>
FTICR	<i>Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance</i>
Ig	Imunoglobulina
Ile	Isoleucina
IPG	Gradiente de pH imobilizado
IP3	Inositol trifosfato
IMC	Índice de Massa Corporal
kDa	Kilodalton
L-AP4	Recetor de glutamato metabotrópico
LC	Cromatografia líquida
LMS	Escala de Magnitude Labelada
MALDI	Ionização e desorção a laser assistida por matriz
mGluR4	Recetor de glutamato metabotrópico
MMP	Metaloproteinase
MT	<i>Medium taster</i>

MS	Espectrometria de massa
NCE	Energia de colisão normalizada
NT	Neurotransmissores
NT	<i>Nontaster</i>
NMDA	Recetor de glutamato ionotrópico
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
PVDF	Fluoreto de polivinilideno
pH	Potencial de Hidrogénio
PIP	Proteína Induzida por Prolactina
PIP2	Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato
PKA	Proteína cinase A
PKD1L3/2L1	<i>Polycystic kidney disease</i> 1L3 e 2L
PLC	Fosfolipase
PMF	<i>peptide mass fingerprinting</i>
PFP	<i>peptide fragment fingerprinting</i>
Pro	Prolina
PROP	6-n-propiltiouracil
PRPs	Proteínas ricas em prolina
PS	Posição social
PTC	Feniltiocarbamida
PTMs	Modificações pós-traducionais
PYY	Péptido YY
Rf	Mobilidade eletroforetica relativa
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SNC	Sistema nervoso central
SNP	Polimorfismo num único nucleótido
ST	<i>Supertaster</i>
TBS-T	Tampão Tris salino com detergente Tween
TFA	Ácido Trifluoroacético
TOF	Tempo de voo
TRCs	Células recetoras do gosto
Tris	Tris(hidroximetil) aminometano
TRPM5	canal recetor de potencial transitório
Val	Valina
ZAG	Zinco- α -2-glicoproteína

Capítulo 1

Introdução Geral

1.1. Comportamento alimentar

Ao longo dos anos, a investigação tem progredido no sentido de elucidar o comportamento alimentar em humanos. O conhecimento dos determinantes das escolhas alimentares é muito importante para prevenção e alteração de comportamentos alimentares de risco para a saúde, como o consumo excessivo de sal e de alimentos ricos em açúcar e gorduras saturadas (Bellisle, 2009). Os mecanismos envolvidos na regulação do comportamento alimentar são complexos, sendo os mesmos influenciados por aspetos fisiológicos, sociais, económicos, psicológicos, educacionais, entre outros (Contento, 2007). Para além destes, e indissociável de uma maior ou menor aceitação e preferência, está a palatabilidade dos alimentos. A palatabilidade, grandemente associada ao valor hedónico (ou seja, relacionado com o prazer) dos alimentos, tem como origem a palavra “palato”, precisamente pela sua associação à perceção sensorial na cavidade oral. Assim, a escolha dos alimentos está estritamente relacionada com a forma como as características sensoriais dos mesmos são percebidas.

1.1.1 Fatores que influenciam o comportamento alimentar

A compreensão dos fatores que influenciam o comportamento alimentar é, cada vez mais, objeto de estudo, uma vez que contribui para a resolução de inúmeros problemas nutritivos. Durante décadas, vários modelos tentaram explicar as escolhas e preferências alimentares, o que permitiu a identificação de vários determinantes das mesmas. Os determinantes que influenciam o comportamento alimentar podem ser agrupados em três categorias principais (figura 1.1): (1) determinantes associadas ao próprio indivíduo, como a idade, sexo, personalidade, nível de conhecimento e experiência alimentar; (2) determinantes ambientais, os quais incluem um conjunto de influências externas sobre o indivíduo, resultantes de fatores que ocorrem no seu ambiente circundante, incluindo o contexto social, cultural e económico; (3) determinantes biológicos, tais como a fome, saciedade, o gosto e a perceção sensorial dos alimentos (Contento, 2007).

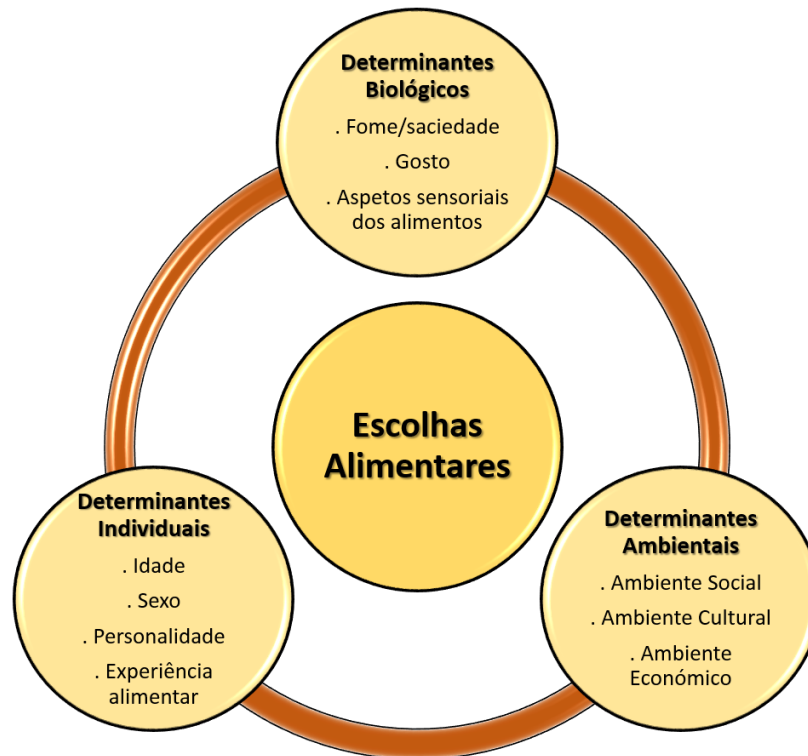


Figura 1.1- Fatores que influenciam as escolhas e comportamento alimentar (adaptado de Contento, 2007).

Os alimentos não são exclusivamente considerados uma fonte de nutrição, sendo frequentemente consumidos pelo prazer que proporcionam. A palatabilidade de um alimento é proporcional ao prazer que se sente quando o ingerimos, dependendo a mesma das propriedades sensoriais do alimento, tais como o sabor, o cheiro, a textura e o aspeto.

De entre os fatores que influenciam o consumo, a perceção do “flavour” dos alimentos constitui um dos mais fortes preditores das escolhas (Duffy, 2007). “Flavour” refere-se à experiência percetiva que temos quando comemos ou bebemos. É um termo que engloba as sensações gustativas, olfativas e tácteis (somatossensitivas) percebidas na cavidade oral.

1.2 Perceção oral

Durante a ingestão de alimentos ocorrem eventos ao nível da boca que são considerados o primeiro passo no processo digestivo, nomeadamente a mastigação, salivação, formação do bolo alimentar e a deglutição (Hiemae, 2004). A mastigação consiste na quebra de alimentos sólidos e preparação do bolo alimentar para a deglutição. É um comportamento oral complexo que reflete a ação do sistema nervoso

central e muitos *inputs* sensoriais periféricos no controlo dos movimentos da mandíbula. O sistema mastigatório é composto pelos maxilares que suportam os dentes, as articulações temporomandibulares, os músculos envolvidos na mastigação (masseter, temporal, pterigóideo medial e lateral) e os sistemas nervoso e vascular associados a esses músculos (Salles *et al.*, 2010). Durante o processamento dos alimentos ao nível da boca, as propriedades físicas dos mesmos são modificadas e a perceção do sabor e textura são afetados

A libertação dos compostos aromatizantes e o seu transporte até aos recetores presentes na boca e no nariz, são fatores chave determinantes da perceção sensorial dos alimentos (Salles *et al.*, 2010). A perceção do “flavour”, durante o consumo de alimentos, é determinada pela natureza e quantidade de compostos voláteis e não voláteis presentes nos mesmos. Numa primeira fase, os compostos químicos são libertados dos alimentos para a fase líquida (saliva), sendo que compostos não voláteis na saliva são detetados pelas papilas gustativas presentes na língua, enquanto que os compostos voláteis, que desencadeiam o aroma, são libertados para a fase de ar presente na boca. Estes compostos voláteis, através das vias retronasais, atingem o bulbo olfativo, sendo interpretados pelo cérebro. Durante todo o processo, a boca e nariz estão em comunicação, sendo que gosto e olfato trabalham juntos para interpretar as características de alimentos e bebidas (Salles *et al.*, 2010). A transferência dos compostos voláteis da boca para o nariz envolve a diluição dos mesmos, tendo concentrações 10 a 100 vezes menores no nariz em comparação com a boca (Linthorpe *et al.*, 2002). A viagem de compostos voláteis da fase oral para a cavidade nasal só é possível quando as duas cavidades comunicam, o que acontece em diferentes momentos do consumo de alimentos em função da textura dos mesmos.

A somatossensação oral refere-se às sensações somáticas que ocorrem no interior da boca (Haggard & de Boer, 2014). Para além das propriedades químicas, as propriedades físicas dos alimentos também são um fator importante no consumo e apreciação dos mesmos. Existem sensações percebidas na cavidade oral que não são classificadas como gostos, tais como as sensações picante, frio e sensações táteis. O picante é uma sensação provocada pela estimulação do nervo trigémeo. Quando comemos uma malagueta, por exemplo, a capsaicina, molécula responsável pelo picante presente em diversos alimentos, dissolve-se na saliva e estimula o nervo trigémeo, causando uma sensação de dor, ardente e desconforto (Carstens *et al.*, 2002). Também a sensação de frio resulta da estimulação do nervo trigémeo pela molécula mentol, presente na menta, ativando os recetores de temperatura que induzem esta sensação (Macpherson *et al.*, 2006).

Quando comemos também temos sensações táteis, como o crocante, áspero, granular e viscoso, por exemplo. Estas sensações, percebidas devido a terminações nervosas que se encontram na língua e mucosa oral, fornecem informações acerca da consistência e a textura do alimento. Durante a mastigação são também percebidas sensações auditivas, sugerindo o crocante dos alimentos, por exemplo (Breslin, 2013).

A adstringência, que muito vulgarmente é confundida com gosto, na realidade é uma sensação tátil. Esta é descrita pela *American Society for Testing of Materials* como “um complexo de sensações provocadas pela constrição do epitélio, devido à exposição a certas substâncias como os taninos”. As moléculas adstringentes são provenientes, principalmente, de plantas, nomeadamente polifenóis, entre os quais taninos (Lesschaeve & Noble, 2005), mas também ácidos (Bajec & Pickering, 2008) e outros agentes desidratantes como álcoois (Lee *et al.* 2012), que podem criar esta sensação oral.

Além das sensações olfativas e táteis, a boca é o local onde ocorre a percepção gustativa dos alimentos.

1.2.1. Sistema gustativo: Anatomia e fisiologia do gosto

Os constituintes não voláteis dos alimentos, dissolvidos na saliva, são detetados por recetores, presentes nas células recetoras do gosto.

Em mamíferos, a deteção do gosto começa com a ativação das células recetoras do gosto, através das quais ocorre a transdução de sinal. Estas células encontram-se organizadas em grupos (50 a 100 células por grupo) e localizam-se nos gomos gustativos, situados na superfície das papilas gustativas, presentes na língua, bem como noutras zonas da cavidade oral, como palato, epiglote e faringe. Existem três tipos de papilas gustativas funcionais, topograficamente dispostas na superfície superior da língua: (1) papilas fungiformes, presentes nos dois terços anteriores da língua; (2) papilas foliadas, presentes nos lados laterais da língua e (3) papilas circunvaladas, presente no terço posterior da língua (figura 1.2). Existe ainda outro tipo de papilas presentes na superfície da língua que, embora não tenham função gustativa, são papilas linguais que conferem rugosidade à língua e fornecem atrito para a manipulação de alimentos na boca: as papilas filiformes (Tepper *et al.*, 2014).

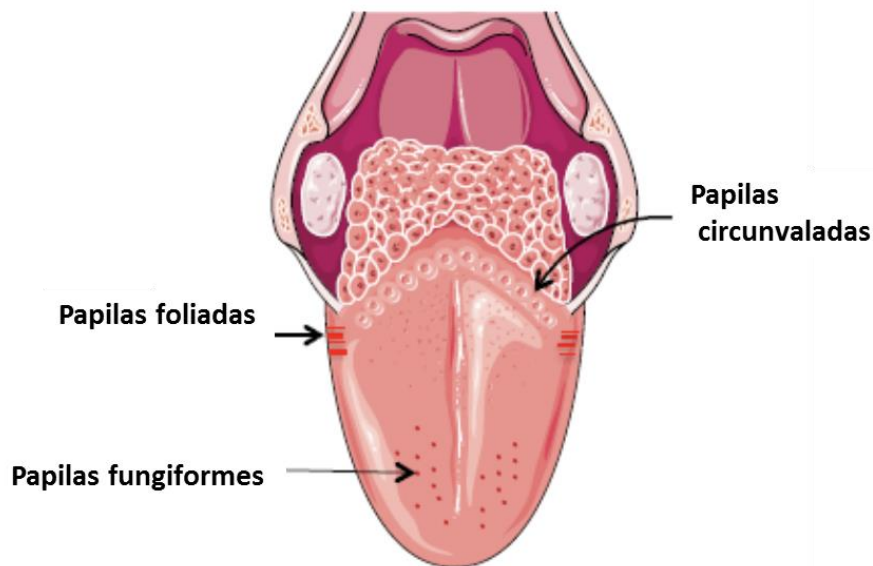


Figura 1.2- Localização dos diferentes tipos de papilas gustativas na língua humana (Adaptado de Besnard *et al.*, 2016).

A inervação dos gomos gustativos é feita através de ramos de três nervos craniais: nervo facial (ramos corda do tímpano e nervo petroso maior) (VII), glossofaríngeo (IX) ou vago (X). Os gomos gustativos presentes nas papilas foliadas anteriores e fungiformes são inervados pelo nervo VII, enquanto os gomos gustativos presentes nas papilas foliadas posterior e circunvaladas são inervados pelo nervo IX. Os gomos gustativos do epitélio do palato são inervados pelo nervo petroso maior superficial. O nervo X inerva os botões gustativos da epiglote (Iwata *et al.*, 2014).

Os gomos gustativos são estruturas em forma de cebola com cerca de 50-100 células gustativas, as quais apresentam microvilosidades que comunicam com o exterior através de uma abertura denominada poro gustativo. As moléculas sápidas dissolvem-se na saliva e entram em contacto com os recetores gustativos através do poro gustativo (Smith & Margolskee, 2006) (figura 1.3).

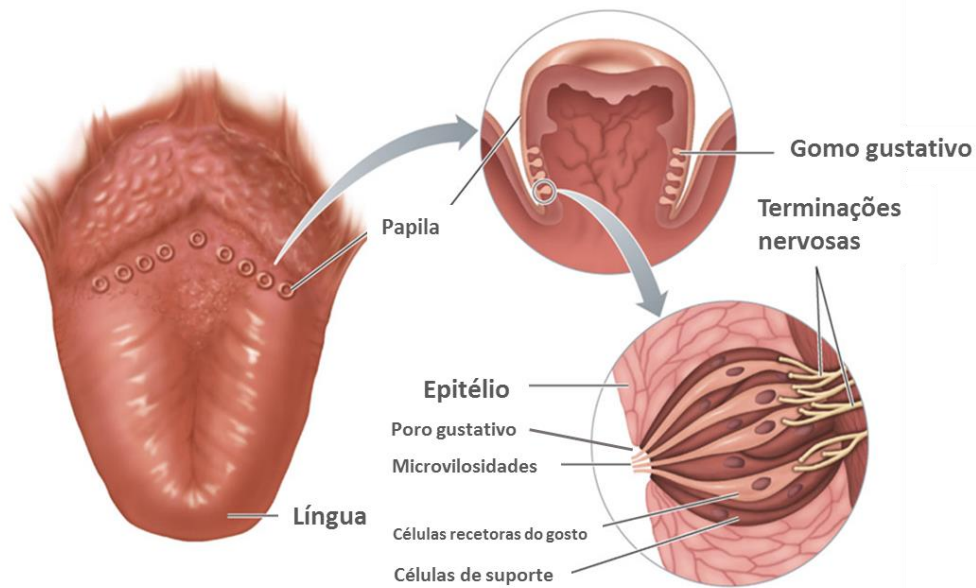


Figura 1.3- Representação da papila e do gomo gustativo (Adaptado de Kumar, 2014).

Os gomos gustativos são constituídos, pelo menos, por 4 tipos distintos de células: tipo I, II, III, IV. Embora os quatro tipos de células possuam a capacidade de comunicar com fibras nervosas gustativas, as células do tipo I participam na detecção do gosto salgado, as células tipo II possuem mecanismos moleculares para a detecção dos gostos doce, amargo e umami e as células tipo III participam na percepção do gosto ácido (Iwata *et al.*, 2014; Besnard *et al.*, 2016). As células tipo IV, além de serem consideradas células de suporte, são também células precursoras que têm a capacidade para se diferenciar em células tipo I, II ou III (Besnard *et al.*, 2016) (figura 1.4). As células tipo I ou “escuras” são as principais constituintes do gomo gustativo (55-75%). As células tipo II ou “claras” são menos numerosas (20%). As células tipo III ou “intermédias” têm presente vesículas na parte basal e a sua característica principal é o contacto sináptico com as fibras nervosas aferentes.

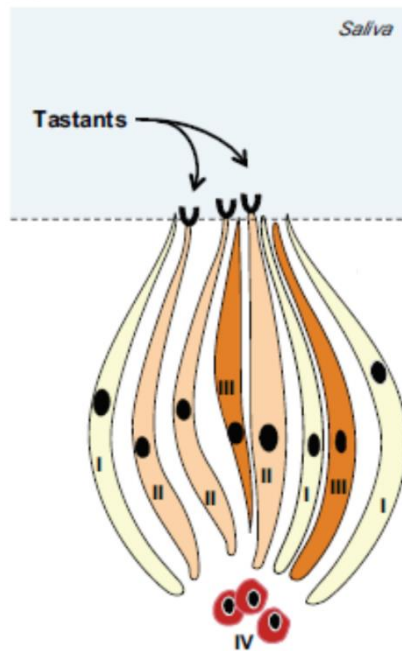


Figura 1.4- Diferentes tipos de células que constituem os gomos gustativos. I- células tipo I; II- células tipo II; III- células tipo III; IV- células tipo IV (Adaptado de Besnard *et al.*, 2016).

As células recetoras do gosto (TCRs) são grandemente polarizadas. Na sua parte apical possuem microvilosidades onde se encontram proteínas recetoras do gosto, que funcionam como “antenas” na deteção do estímulo gustativo. O tipo de proteína recetora em cada microvilosidade é específica para o tipo de gosto que será percebido. As proteínas recetoras podem ser: proteínas que constituem canais iónicos e proteínas dependentes de ligandos – GPCRs (recetores acoplados a Proteína G). A região basolateral destas células é especializada na transmissão sináptica (Gilbertson *et al.*, 2000).

No que diz respeito à forma como o gosto é percebido são aceites, atualmente, duas teorias: “*labelled-line*” e “*across-fibre*”. De acordo com a primeira (“*labelled line*”), cada célula recetora do gosto é especializada na deteção de um único gosto. De acordo com esta teoria, existem axónios que estão “sintonizados” para um gosto básico específico e a célula recetora do gosto terá que contactar com um desses axónios. Por outro lado, o modelo “*across fibre*” tem duas teorias, sendo que uma defende que cada célula recetora do gosto tem capacidade para responder a diferentes gostos e conecta-se com diferentes áreas do cérebro, reconhecendo o gosto em função do recetor ao qual a molécula sávida se liga e outra teoria que defende que ainda que cada célula só tenha a capacidade de detetar um tipo de gosto, os axónios que conectam com a célula não são especializados (Chandrashekar *et al.*, 2006).

1.2.2. Gostos básicos

Atualmente é considerada a existência de 5 gostos básicos: salgado, ácido, doce, amargo e umami. Há autores que sugerem a possibilidade da gordura e do cálcio serem percebidos como gostos básicos, ainda que isso não seja universalmente aceite (Iwata *et al.*, 2014).

As substâncias químicas que provocam os gostos salgado e ácido, atuam diretamente através de canais iônicos, enquanto que as substâncias químicas responsáveis pelo gosto doce, amargo e umami, ligam-se a recetores que iniciam uma via de sinalização para o interior das células, resultando numa abertura e fecho de canais iônicos (Smith & Margolskee, 2006). A molécula *gustducin*, também conhecida como subunidade α da proteína G, é um elemento-chave nas vias de sinalização destes três últimos gostos básicos. Esta proteína encontra-se ligada à porção intracelular dos recetores, sendo que, quando as moléculas sápidas se ligam aos mesmos, são alterações nesta proteína que conduzem a um conjunto de reações químicas que levam à abertura e fecho de canais iônicos, tornando o interior da célula carregado positivamente (Smith & Margolskee, 2006). A implicação desta proteína na transdução do gosto é evidenciada em estudos, como por exemplo um estudo com ratos, onde animais *knockout* para a α -*gustducin*, apresentaram uma diminuição na capacidade de perceção do gosto doce, bem como de compostos amargos e relacionados com o gosto umami (Reed & Margolskee 2010).

1.2.2.1. Salgado

O gosto salgado é um gosto, normalmente, preferido a concentrações que podem ser mais ou menos baixas, dependendo dos indivíduos, mas que induz rejeição quando em concentrações elevadas. A deteção do gosto salgado ocorre através de duas vias diferentes. Uma delas (a mais bem compreendida) consiste na entrada de sódio através de canais seletivamente permeáveis a este ião (ENaC), localizados nas microvilosidades da célula recetora (Chandrashekar *et al.*, 2006). A outra via, consiste em canais que não distinguem entre iões Na^+ , K^+ e NH_4^+ , sendo esta via associada à deteção na presença de concentrações elevadas de sal. A acumulação de iões sódio, no interior da célula, promove a despolarização da membrana, resultando na entrada de iões Ca^{2+} no interior da célula. O aumento de cálcio, por seu lado, promove a libertação de neurotransmissores acumulados em vesículas que, através de sinapses, transmitem

a mensagem ao cérebro (figura 1.5). A repolarização da membrana é efetuada pela abertura de canais de potássio e libertação destes iões (Smith & Margolskee, 2006).

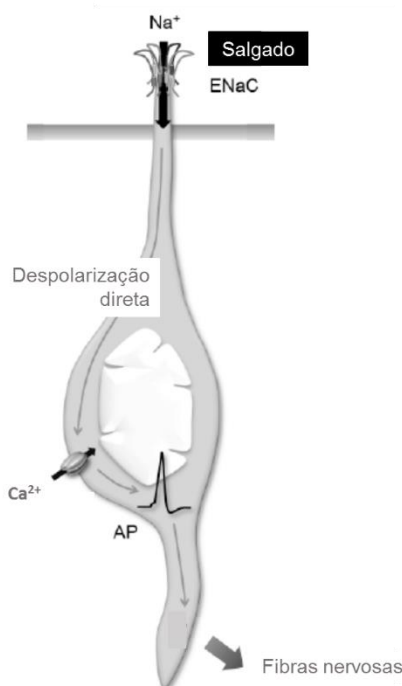


Figura 1.5 – Diagrama esquemático da via de transdução do gosto salgado nas células recetoras do gosto. ENaC – canal de sódio epitelial (adaptado de Iwata *et al.*, 2014).

1.2.2.2. Ácido

O gosto ácido é principalmente desencadeado por ácidos. Em termos evolutivos o gosto ácido, nos primatas, parece ter-se desenvolvido no sentido de sinalizar o grau de maturação dos frutos, conduzindo à escolha dos mais maduros. Têm sido identificados diferentes recetores potencialmente envolvidos na deteção do gosto ácido. Foram referidos canais catiónicos ativados por protões extracelulares como recetores deste gosto: canais iónicos sensíveis a compostos ácidos (ASICs), canais fechados por nucleótidos cíclicos ativados por hiperpolarização (HCNs), canais de potássio e o heterodímero PKD2L1 e PKD1L3 (*Polycystic kidney disease 1L3 e 2L1*). Estes últimos são pertencentes à família de canais iónicos TRP (do inglês *Transient receptor potential channel*) (Ishimaru *et al.*, 2006; Iwata *et al.*, 2014) e permeáveis a Ca^{2+} , tendo sido também sugeridos como estando envolvidos na receção do gosto amargo.

Os protões entram na célula e produzem uma acidificação da mesma, a nível intracelular, que resulta no bloqueio dos canais de potássio, com a consequente despolarização da membrana e libertação de neurotransmissores (Iwata *et al.*, 2014) (figura 1.6). A necessidade de entrada de protões para dentro da célula, para que haja

o desencadear da resposta e percepção de ácido parece ajudar a explicar o porquê de ácidos fracos, como o ácido acético (em que há penetração na membrana) desencadeiam uma resposta mais forte do que ácidos fortes, como o ácido clorídrico (que não penetra a membrana da célula) (Roper, 2007).

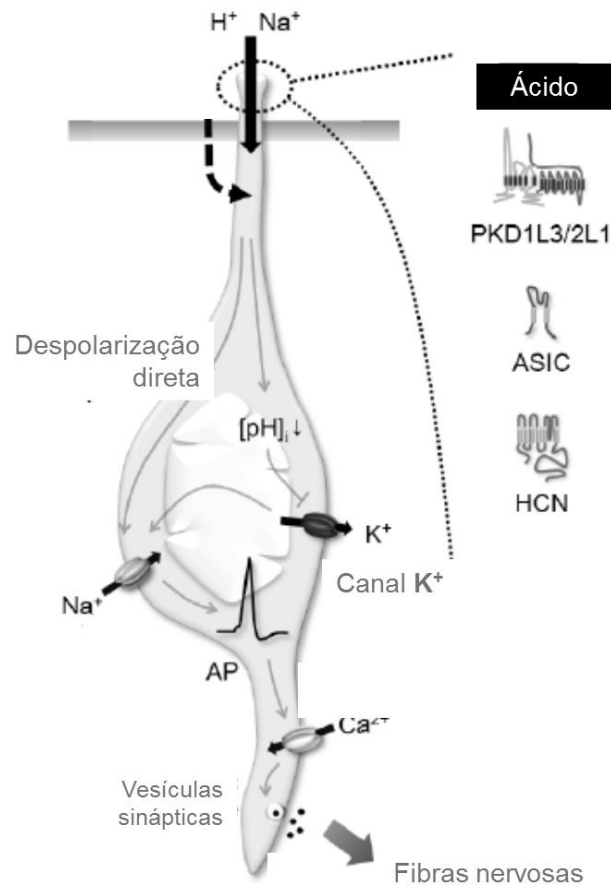


Figura 1.6 – Diagrama esquemático da via de transdução do gosto ácido nas células recetoras do gosto. ASICs- canais iônicos sensíveis a compostos ácidos; HCN – canais fechados por nucleótidos cíclicos e ativados por hiperpolarização. PKD1L3/2L1 - *Polycystic kidney disease 1L3 e 2L1* (adaptado de Iwata *et al.*, 2014).

1.2.2.3. Umami

O umami é um termo derivado do Japonês “Umai” que significa delicioso. Umami é o paladar dominante em comida que contém o composto L-Glutamato.

Quanto aos recetores do L-Glutamato, existem evidências da ocorrência de recetores de glutamato ionotrópicos (NMDA) e metabotrópicos (L-AP4 e mGluR4) nas células gustativas dos mamíferos. O recetor mGluR4 é um GPCR que se encontra

também no Sistema Nervoso Central (SNC) (Fábián *et al.*, 2015). O gosto umami é mediado pelo recetor constituído pelas unidades T1R1 e T1R3. Este recetor está acoplado a proteína G. Quando a molécula sávida se liga ao recetor, este ativa a proteína G, que por sua vez ativa a enzima fosfolipase C β 2 (PLC β 2), gerando os mensageiros secundários inositol trifosfato (IP3), diacilglicerol (DAG) e H⁺. O IP3 atua a nível do recetor IP3, levando à libertação de cálcio das reservas intracelulares, que vai ativar o recetor TRPM5 e a entrada de sódio. Isto desencadeia a despolarização da membrana e libertação de neurotransmissores (figura 1.7).

1.2.2.4. Amargo

O gosto amargo é um gosto para o qual a reação é aversiva de forma inata. Esta aversão inata aparece como defesa contra a ingestão de alimentos potencialmente tóxicos ou antinutricionais, os quais desencadeiam, normalmente, esta sensação (Chandrashekar *et al.*, 2000). O gosto amargo é mediado pela família de recetores T2R. Estes fazem parte de uma família de recetores com 25 membros, sendo que alguns respondem a uma grande diversidade de moléculas, e outros são extremamente seletivos, respondendo apenas a um número limitado de compostos amargos (Meyerhof *et al.*, 2010) (figura 1.7).

A percepção do amargo é iniciada pela interação de moléculas sápidas com recetores T2R acoplados a proteínas G nas membranas das células recetoras do gosto. Os heterotrímeros da *gustducin*, que foram ativados via estimulação dos recetores T2R por um estímulo amargo, medeiam duas respostas nas células recetoras do gosto: estimulação da fosfodiesterase (PDE) e hidrólise de cNMPs [*Cyclic Nucleoside Monophosphates*, cAMP (*Cyclic adenosine monophosphate*) ou cGMP (*Cyclic guanosine monophosphate*)] via α - *gustducin* (esta diminuição dos níveis de cNMPs pode levar a uma desinibição de canais inibidos por nucleótidos cíclicos, levando ao aumento de Ca²⁺) e o aumento dos níveis de IP3/DAG via $\beta\gamma$ - *gustducin*, de forma semelhante ao que foi descrito para o umami (Margolskee, 2002).

Existem substâncias amargas, permeáveis à membrana celular, que não interagem com o recetor e ativam diretamente a proteína G. São exemplos o quinino e a cafeína (Naim *et al.*, 2002).

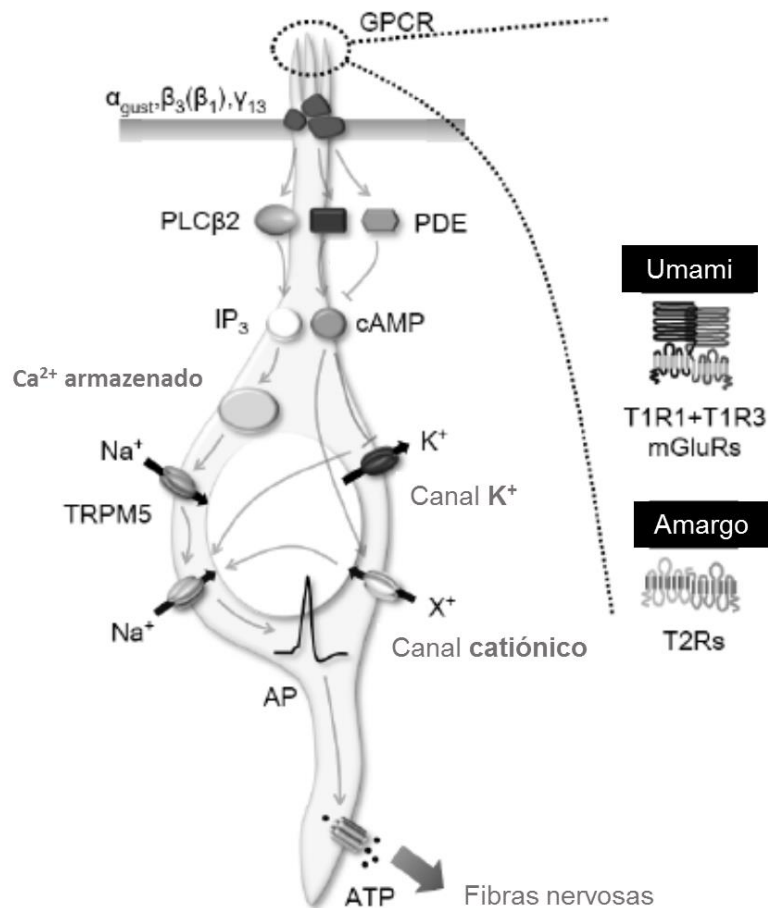


Figura 1.7 – Diagrama esquemático da via de transdução dos gostos umami e amargo nas células recetoras do gosto. TRPM5 – canal recetor de potencial transitório; PLC- fosfolipase; PDE – fosfodiesterase; IP₃ – inositol trifosfato; GPCR - receptores acoplados a Proteína G (adaptado de Iwata *et al.*, 2014).

1.2.2.5. Doce

O gosto doce está associado a prazer inato. Está associado a alimentos ricos em hidratos de carbono, e por isso com elevado valor em termos energéticos. A percepção do gosto doce não se realiza pela entrada de moléculas doces no interior da célula, mas sim pela ligação das mesmas a receptores das células do gosto, mais precisamente receptores acoplados a proteínas G (GPCR).

Investigação recente demonstrou que o recetor do gosto doce é um heterodímero composto por duas subunidades proteicas, T1R2 (recetor tipo 1, membro 2) e T1R3 (recetor tipo 1, membro 3), codificados pelos genes *TAS1R2* e *TAS1R3*, localizados no cromossoma 1 humano (Liao & Schultz, 2003), apresentando a capacidade para detetar açúcares naturais, incluindo sacarose, glucose, frutose e maltose (Zhao *et al.*, 2003). O T1R2 é o componente específico para a percepção do gosto doce, visto que o recetor

T1R3 está também envolvido na percepção do umami quando dimerizado com o recetor T1R1 (Zhao *et al.*, 2003).

Tal como acontece nos gostos umami e amargo, estes recetores encontram-se acoplados a uma proteína G, mais especificamente à subunidade α - *gustducin*, codificada pelo gene *GNAT3* e seletivamente expressa em células do gosto.

Foram propostos dois modelos de transdução de sinal para este gosto: a via GPCR-Gs-AMPC, na qual a sacarose e outros açúcares levam à ativação da proteína G através de GPCRs acoplados à subunidade T1R3, fazendo com que a adenilciclase (AC) gere AMPC. O AMPC pode estar implicado diretamente no influxo de catiões, nomeadamente o Ca^{2+} , através de canais iónicos acoplados ao AMPC, ou atua duma forma indireta, pela ativação da proteína cínase A (PKA), a qual fosforila o canal iónico de K^+ , presente na membrana basolateral, levando ao seu encerramento, despolarização da célula e permitindo um influxo de Ca^{2+} que leva à libertação de neurotransmissores (NT) (Iwata *et al.*, 2014). A segunda via proposta é a via GPCR-Gq/G $\beta\gamma$ -IP₃, na qual os açúcares artificiais (adoçantes) interagem e ativam subunidades da proteína Gq da α - *gustducin* ou por subunidades G $\beta\gamma$. A ativação de G α_q ativa a PLC (fosfolipase) β_2 que por sua vez leva à formação de IP₃ pela quebra do PIP₂ e DAG. O IP₃ e o DAG promovem a libertação de Ca^{2+} , que se encontra armazenado para o citosol, ocorrendo despolarização e posterior libertação do neurotransmissor. Estas duas vias coexistem na mesma célula recetora do gosto (Margolskee, 2002) (figura 1.8).

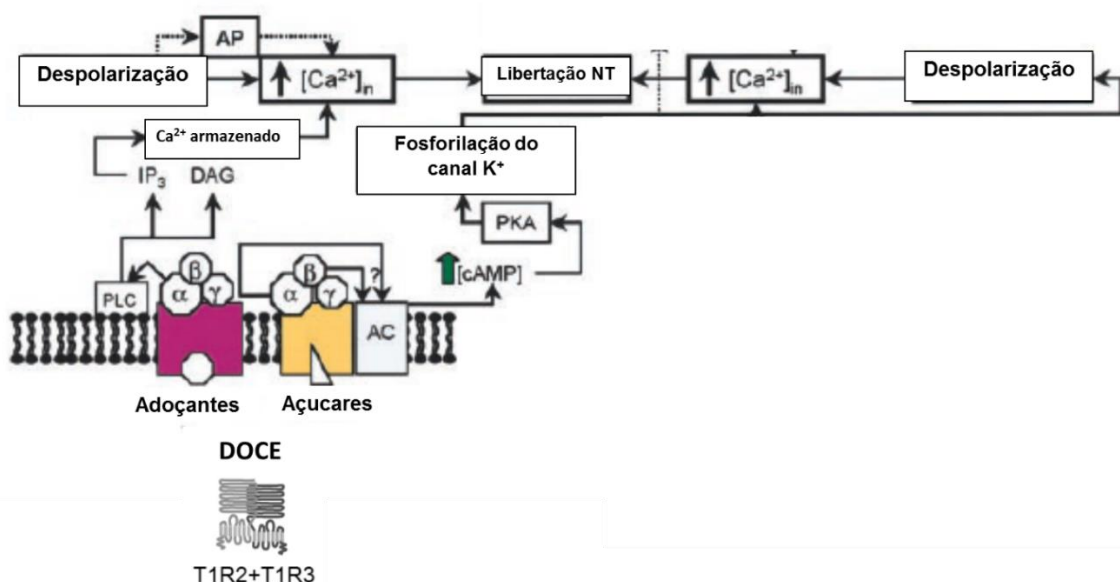


Figura 1.8 – Diagrama esquemático da via de transdução do gosto doce nas células recetoras do gosto. AC- adenilato ciclase; PKA- proteína cinase A; DAG – diacilglicerol (adaptado de Margolskee, 2002).

1.2.3. Sensibilidade gustativa: definição e testes para avaliação da mesma

Por sensibilidade gustativa entende-se a capacidade/intensidade com que cada indivíduo percebe os diferentes gostos. A sensibilidade gustativa varia entre indivíduos e é um fator determinante nas escolhas alimentares e estado nutricional (Tepper *et al.*, 2014).

Os testes de sensibilidade gustativa têm como objetivo a medição da capacidade de perceber, identificar e/ou diferenciar qualitativa ou quantitativamente um ou mais estímulos. A sensibilidade gustativa pode ser avaliada através de testes para avaliação dos limiares de detecção, onde apenas se avalia a capacidade para perceber “algo” mais que água, ou dos limiares de reconhecimento, onde o tipo de estímulo detectado tem que ser reconhecido (ex. doce, amargo, etc.). O limiar de detecção é a menor concentração de um determinado soluto para que a presença do mesmo seja detectada numa solução. Por outro lado, o limiar de reconhecimento corresponde à menor concentração de um determinado soluto necessária para promover a sua identificação. Geralmente, os limiares de reconhecimento são mais elevados que os de detecção, sendo necessário uma concentração mais elevada do estímulo gustativo para que o mesmo seja identificado (Keast & Roper, 2007). A diferença entre estes dois tipos de limiares depende do treino dos indivíduos: mais treinados e/ou habituados a um estímulo apresentam limiares de detecção mais próximos dos limiares de reconhecimento (Hoehl *et al.*, 2013)

Para além dos limiares de detecção, um indivíduo pode ser avaliado para os seus limiares de tolerância, o que é conhecido como avaliação de “*suprathreshold*”. No entanto, há alguma controvérsia relativamente aos limiares de detecção se correlacionarem, ou não, com limiares de tolerância. Apesar de alguns estudos observarem relação (Bufe *et al.* 2005), outros não (Webb *et al.*, 2015).

A quantificação de papilas fungiformes também tem sido utilizada na avaliação da função gustativa, por diversos autores. De acordo com alguns, o número de papilas fungiformes é proporcional à intensidade percebida do estímulo. Ou seja, há autores que defendem que quanto maior número de papilas fungiformes um indivíduo tiver, mais forte é o sinal enviado para o sistema nervoso central (onde há o reconhecimento do gosto), resultando assim na percepção mais intensa (Hayes & Duffy, 2007). No entanto, nem todos os autores suportam esta teoria. Por exemplo, Delwiche *et al.* (2001) referiram que a tendência para a relação entre densidade de papilas fungiformes e intensidade percebida de estímulo é muito variável e só se observa para indivíduos com sensibilidade moderada e depende do tipo de composto em avaliação.

A existência de diferenças inter-individuais na sensibilidade gustativa foram descobertas acidentalmente por Arthur L Fox, em 1931, enquanto o mesmo trabalhava no processo de sintetização do composto feniltiocarbamida (PTC). Neste caso específico, alguns cristais do composto dispersaram-se no ar, o que fez com que alguns dos seus colegas percebessem o gosto amargo do composto e outros não. Investigações posteriores revelaram que 30% dos indivíduos não percebem o gosto amargo deste composto, enquanto a maioria o percebe de moderado a extremamente intenso (Fox, 1932). Esta simples observação conduziu a vários estudos acerca da variabilidade na capacidade de detetar o gosto amargo dos compostos PTC e 6-n-propiltiouracil (PROP), compostos quimicamente semelhantes, pertencentes à classe das tioureias, contendo um grupo tiocianato ($N-C=S$) responsável pelo seu gosto amargo (Zhao *et al.*, 2003). Desde aí, e ao longo dos anos, os indivíduos têm sido classificados em sensíveis - “*tasters*” ou não-sensíveis - “*nontasters*”, consoante a sua capacidade de detetar o gosto amargo desses compostos. A avaliação da sensibilidade para estes compostos tem sido utilizada como marcadora da sensibilidade em geral (Tepper, 2008).

Até ao momento, diversos métodos psicofísicos têm sido utilizados para classificar os indivíduos consoante a sensibilidade ao amargo do composto PROP. Estes métodos podem ser feitos através da prova de soluções ou tiras gustativas (em papel ou edíveis).

Lawless (1980) desenvolveu um método simples que envolve a prova de uma única solução de PROP cuja concentração é o limiar de tolerância (*suprathreshold*). Este procedimento, apesar de ter sido usado para classificar adultos e crianças, não permite distinguir *médium tasters* de *supertasters*, limitando a sua aplicação em diversas pesquisas (Mela, 1990; Keller *et al.*, 1999).

Para esta classificação fenotípica, na sensibilidade para PROP/PTC, a deteção de limiares (*Threshold techniques*) tem sido bastante utilizada (Bartoshuk *et al.*, 1994). No entanto, este método é dispendioso em termos de tempo e trabalho, requerendo a utilização de muitos indivíduos para a prova de diversas soluções. Além disso, à semelhança do que foi referido, a determinação de limiares, por si só, pode não prever os *suprathreshold* para o PROP ou mesmo a sensibilidade para um outro estímulo oral (Bartoshuk *et al.*, 1994). Para além disso, não permite distinguir *médium tasters* de *supertasters* (Bartoshuk *et al.*, 1994). Por esta razão, os métodos de deteção de limiares são frequentemente utilizados em conjunto com métodos para avaliar limiares de tolerância. Num método bem estabelecido (Bartoshuk *et al.*, 1994), indivíduos avaliam cinco soluções de concentrações baseadas em limiares de tolerância de PROP e NaCl, utilizando uma escala de magnitude labelada. Este método assenta no princípio de que

a sensibilidade ao NaCl não varia consoante a resposta ao PROP (Bartoshuk *et al.*, 1994), sendo o NaCl utilizado como referência padrão para comparação com o PROP. Os estudos em que este método é utilizado, mostram que indivíduos *nontasters* classificam as soluções de NaCl com maior intensidade do que as soluções de PROP, *médium-tasters* classificam de modo semelhante os dois conjuntos de soluções e *supertasters* classificam as soluções de PROP com maior intensidade do que as de NaCl (Drewnowski *et al.*, 1998).

Tepper *et al* (2001), desenvolveram um método simples e confiável para classificar indivíduos com base na sensibilidade gustativa ao PROP. Este método foi uma adaptação do método de *suprathreshold* acima referido e desenvolvido por Bartoshuk *et al.* (1994). Com efeito, o procedimento consiste na prova de três soluções de PROP (0,032; 0,32 e 3,2mmol/L) e três soluções de NaCl (0,01; 0,1 e 1,0mmol/L) com concentrações crescentes, representando as concentrações mais elevadas, médias e baixas utilizadas em estudos anteriores (Bartoshuk *et al.*, 1994). Um total de quatro sessões de teste foram realizadas em dias separados, durante um período de seis meses. Neste método é utilizado uma Escala de Magnitude rotulada (LMS) para classificar a intensidade das soluções. Uma LMS é uma escala quase logarítmica com rótulos equivalentes à magnitude estimada (Green *et al.*, 1993). A escala apresenta na sua extremidade inferior a frase “escassamente detetado” e na extremidade superior a frase “mais forte que o imaginável”. Esta escala permite que os indivíduos classifiquem livremente a intensidade do estímulo em relação ao estímulo oral “mais forte que o imaginável” que conhecem da experiência quotidiana. Esta escala contrasta com outras escalas de classificação padrão, nas quais as respostas são limitadas aos rótulos “muito forte” ou “extremamente forte”. A escala LMS é útil para quantificar vários tipos de sensações orais, particularmente aquelas que são fortes ou persistentes, como o amargo e a adstringência (Green *et al.*, 1993). Este método é aplicável a adultos e crianças, desde que as mesmas tenham idade suficiente para compreender o funcionamento de uma LMS.

A principal desvantagem dos métodos que envolvem a prova de soluções é o facto de não serem práticos na utilização em estudos de grande escala. A necessidade de desenvolver um método rápido e confiável para caracterizar a função gustativa em grandes amostras para pesquisa epidemiológica, fez com que se desenvolvessem os métodos baseados em tiras gustativas: tiras de papel de filtro ou tiras edíveis. A aplicação de métodos baseados na utilização de tiras de papel de filtro impregnadas com PROP ou PTC (*taste strips*) para classificar indivíduos consoante a sua sensibilidade gustativa, foi descrito há muitos anos por Blakeslee e Fox (1932). No entanto, este método apresentou uma taxa elevada de respostas denominadas “falsos

positivos” com as tiras impregnadas com PTC, ou seja, indivíduos *nontaster* que referiram o gosto amargo da tira de papel, colocaram em causa a validade deste método (Lawless, 1980). Além disso, esta abordagem pode apresentar erros de classificação, uma vez que não existe um padrão de referência (como o NaCl, por exemplo) que é entendido como sendo igualmente intenso para todos os indivíduos. Ainda assim, a simplicidade destes testes promoveu um renovado interesse na utilização dos mesmos em investigação nesta área. Smutzer *et al.* (2013), desenvolveram um método válido baseado em tiras edíveis compostas por 400-600nmol de PROP para classificar indivíduos com base em *suprathresholds* para este composto. Este método permite a determinação da sensibilidade gustativa em adultos e crianças.

1.2.4. Fatores que afetam a sensibilidade gustativa

Um dos principais fatores que influenciam as escolhas alimentares é a percepção dos alimentos e mais particularmente o gosto. A percepção gustativa é importante para garantir a aquisição de nutrientes e evitar a ingestão de substâncias tóxicas. A aversão provocada pelo gosto amargo, por exemplo, é um meio de prevenção que os mamíferos utilizam para evitar a ingestão de substâncias alimentares prejudiciais (Chandrashekar *et al.*, 2000).

A variabilidade inter-indivíduo na percepção do gosto amargo, referida no ponto anterior, levou à realização de diversos estudos acerca dos mecanismos subjacentes à mesma. Até ao momento, existem três fatores principais que explicam a variabilidade ao gosto amargo: a variação genética específica (polimorfismos presentes nos recetores do gosto) (Wooding *et al.*, 2004), variação genética genérica (por exemplo, a densidade das papilas gustativas) (Tepper & Nurse, 1997) e fatores ambientais, como os hábitos alimentares (Ahrens *et al.*, 2015) ou mesmo a composição da saliva (Dsamou *et al.*, 2012; Cabras *et al.*, 2012; Morzel *et al.*, 2014).

O caso das diferenças na sensibilidade para os compostos PTC e PROP, referido anteriormente, foi aquele que motivou mais estudos na tentativa de perceber os motivos pelos quais diferentes indivíduos apresentam diferentes preferências. Diversos estudos referem que a capacidade de provar o PROP é uma característica hereditária (Kalmus, 1958). O recetor do gosto que responde aos compostos PTC e PROP é codificado pelo gene *TAS2R38*, tendo sido identificados polimorfismos neste gene que estão relacionados com diferenças na percepção do gosto amargo (Bufe *et al.*, 2005). A diversidade alélica deste gene é devida a três polimorfismos num único nucleótido

(SNPs), que resultam na substituição de três aminoácidos (Pro49Ala, Ala262Val e Val296Ile), dando origem a dois haplótipos comuns: PAV, a variação dominante, e AVI, a variação recessiva. Indivíduos homocigóticos ou heterocigóticos para o haplótipo PAV, percebem o amargo do PROP a baixas concentrações e são considerados “sensíveis” (*tasters*), enquanto que indivíduos que não percebem o PROP ou percebem apenas em concentrações elevadas, são homocigóticos para o haplótipo AVI e consideram-se “pouco sensíveis” (*nontasters*) (Wooding *et al.*, 2004).

Apesar das alterações genéticas no recetor de membrana constituírem um fator importante, estas não explicam completamente as variações observadas na sensibilidade gustativa (Hayes & Duffy, 2008). De acordo com Genick *et al* (2011), aproximadamente 30% da variação fenotípica observada deve ser explicada por outros fatores, como por exemplo alterações noutros recetores gustativos ou no ambiente oral que envolve os recetores em questão. Diferenças individuais na percepção do amargo dos compostos PTC/PROP têm também sido atribuídas a fatores como a composição da saliva e as propriedades físicas, número, tamanho e morfologia das papilas gustativas (Tepper *et al.*, 2014). Yackinous & Guinard (2002) observaram que indivíduos super-sensíveis para o PROP têm um número significativamente superior de papilas gustativas, comparativamente a indivíduos não-sensíveis. Um estudo anterior tinha também reportado uma correlação significativa entre a densidade de papilas fungiformes e intensidade percebida de PROP (Tepper & Nurse, 1997). Esta densidade superior de papilas gustativas e, conseqüentemente, de gomos gustativos, tem sido também considerada como hipótese para explicar as diferenças entre variações na sensibilidade a este composto.

A idade e o dimorfismo sexual têm sido objeto de estudo na influência da sensibilidade gustativa. Diversos grupos de investigação demonstraram alterações na sensibilidade gustativa em função do género e da idade, sendo que essas alterações estão dependentes do tipo de gosto em análise (Tepper *et al.*, 2014). A sensibilidade para o gosto doce tem sido uma das mais estudadas em termos de possíveis influências da idade e do género. Enquanto que alguns estudos observaram uma diminuição da sensibilidade para o gosto doce com a idade (Mojet *et al.*, 2001), outros não encontraram diferenças na sensibilidade para este gosto entre adultos e crianças (Yamauchi & Yoshimura, 2002; Nordin *et al.*, 2003). Um estudo recente, demonstrou que crianças mais jovens são menos sensíveis ao doce do que adolescentes, e os rapazes menos sensíveis que as raparigas (Joseph *et al.*, 2016). Além da sensibilidade para o gosto doce, outros estudos reportaram uma diminuição na sensibilidade para os gostos ácido (Nordin *et al.*, 2003), salgado e amargo (Nordin *et al.*, 2003; Yamauchi *et al.*, 2002) com a idade. Também Yoshinaka *et al.* (2015) referiram que adultos jovens apresentam um

limiar de reconhecimento, para os quatro gostos básicos, mais baixo em comparação com indivíduos mais velhos.

No que diz respeito a um efeito do género na sensibilidade gustativa, os estudos também não são consensuais. Em 1959, Cohen & Gitman investigaram a sensibilidade para os cinco gostos básicos, sugerindo que, em geral, os homens apresentam maior dificuldade no reconhecimento dos gostos, em comparação com as mulheres. Yoshinaka *et al.* (2015) observaram que, em adultos, as mulheres apresentam limiares de reconhecimento mais baixo para os gostos amargo, ácido e salgado, em comparação com os homens. Curiosamente, a diferença entre sexos não se observa tendo em conta o gosto doce. Yamauchi *et al.* (2002), mostraram diferenças significativas nos limiares de deteção do gosto amargo entre homens e mulheres jovens, diferenças essas que não se observaram para os restantes gostos básicos. Há autores que referem que os limiares de reconhecimento dos gostos doce e amargo são afetados pelo género num grupo de indivíduos mais velhos, mas não num grupo mais jovem, enquanto que os limiares de reconhecimento dos gostos ácido e salgado são afetados pelo sexo em ambos os grupos (Wardwell *et al.* 2009).

Hormonas sexuais, como progesterona e estrogénio, têm também um efeito na ingestão de alimentos e sensibilidade gustativa. Estudos demonstraram que a progesterona aumenta a ingestão de alimentos, enquanto os estrogénios diminuem. Outros estudos demonstraram um aumento da sensibilidade para os gostos amargo e salgado durante a gravidez. Esses estudos colocaram a hipótese de que as hormonas sexuais referidas podem atuar ao nível dos gomos gustativos (revisto em Faas *et al.*, 2010).

Certos polipéptidos metabólicos, como a leptina, grelina, insulina, neuropéptido Y e péptido YY, também parecem afetar a sensibilidade gustativa. A ação destes péptidos/hormonas poderá ser sistémica ou mesmo através da saliva, uma vez que os mesmos foram observados neste fluido e os seus recetores estão expressos nas células gustativas, sugerindo um papel dos mesmos na função do gosto (Fabián *et al.*, 2015).

A leptina, hormona responsável pelo controlo da ingestão de alimentos, é produzida pelos adipócitos e atua essencialmente ao nível do hipotálamo, exercendo um efeito neuroendócrino na ingestão de alimentos e metabolismo energético. No entanto, foram identificados recetores de leptina nas células recetoras do gosto (Kawai *et al.* 2000), sugerindo a sua ação direta neste. Há resultados controversos em termos de ação de leptina na sensibilidade gustativa, apesar dos diversos autores serem concordantes em relação ao efeito ser só para o gosto doce. Enquanto nalguns estudos se observou que níveis circulantes de leptina mais elevados conduzem a menor sensibilidade para o gosto doce (Umabiki *et al.*, 2010; Niki *et al.*, 2015; Yoshida *et al.*,

2013), noutros essa diferença na sensibilidade para o doce, induzida pela leptina, não foi confirmada (Glendinning, 2015).

A grelina, hormona indutora de apetite, produzida por células gástricas, é processada a partir de um precursor maior e uma enzima denominada convertase PC1/3. Estudos recentes referem a presença desse precursor e da enzima convertase nas células do gosto, bem como a do recetor da grelina (GSHR). Isto sugere uma atuação autócrina desta hormona nas células do gosto. Ratos knockout para o recetor GSHR, apresentam uma resposta diminuída aos gostos ácido e salgado, sugerindo que a grelina pode ter um papel modulador local na resposta a estes gostos (Fabián *et al.*, 2015). Também o péptido semelhante a glucagina (GLP-1) foi associado à sensibilidade gustativa: Estudos recentes observaram que uma rutura na sinalização de GLP-1 leva a uma diminuição significativa da sensibilidade ao gosto doce e um aumento da sensibilidade ao gosto umami e ao ácido cítrico em ratos. Esta observação, sugere que a GLP-1 desempenha uma função na perceção do gosto doce, umami e ácido, de forma Parácrina (Fabián *et al.*, 2015). O péptido YY, indutor de saciedade, produzido no intestino, também foi observado como responsável pela modulação da resposta ao gosto amargo e a emulsões lipídicas (La Sala *et al.*, 2013).

Embora variações individuais na perceção do gosto doce estejam associadas a fatores como a idade (Fukunaga *et al.*, 2005) e estado hormonal (Nakamura *et al.*, 2008), fatores hereditários também contribuem para a variabilidade dessa sensibilidade (Bretz *et al.*, 2006). Um estudo de base populacional, através de medidas psicofísicas, demonstrou que variações genéticas nos genes *TAS1R3* e *GNAT3* estão fortemente associadas com diferenças na perceção da sacarose (Fushan *et al.*, 2009; 2010). No entanto, essas variantes genéticas explicam apenas 16% da perceção do gosto doce, o que significa que o impacto dos fatores genéticos na variação da sensibilidade gustativa ao doce, não está totalmente compreendido. Fushan *et al.* (2009), pesquisaram polimorfismos nos genes *TAS1R2* e *TAS1R3* e correlacionaram-nos com a diferente perceção do gosto doce apresentada por um grande número de indivíduos. Com efeito, observaram que variações nas bases C/T, presentes nos alelos, alteram sequências de aminoácidos em ambas as subunidades do recetor. Estes autores demonstraram que indivíduos com polimorfismos na sequência do promotor do gene *TAS1R3*, apresentaram uma diminuição da sensibilidade à sacarose, constatando-se que alterações genéticas na região promotora do gene codificante do recetor, causam alterações na perceção deste gosto.

Para além dos já referidos, foram referidos outros fatores que influenciam a sensibilidade gustativa. Kim *et al.* (2006), demonstraram que a variação étnica tem um papel importante na diferente sensibilidade. Estes autores observaram que indivíduos

que possuem o alelo T, associados à diminuição da sensibilidade à sacarose, são mais comuns na África Subsariana, enquanto o alelo C é a principal variante em todas as regiões geográficas, com exceção da África. Os autores colocaram a hipótese que em climas tropicais, onde as fontes de açúcar são abundantes, a capacidade de saborear uma pequena quantidade de açúcar era menos importante do que nos climas frios, onde as fontes de açúcar são escassas.

Ao contrário do que se observa nos adultos (*Fushan et al.*, 2009), não foi encontrada relação entre uma variante no gene *TAS1R3* e limiares de detecção de sacarose nas crianças (*Joseph et al.*, 2016). Do mesmo modo, polimorfismos no gene *GNAT3* (gene que codifica a subunidade $\alpha 3$ da proteína *gustducin*) que estão relacionados com a sensibilidade gustativa em adultos (*Fushan et al.*, 2010), não se relacionaram com a sensibilidade gustativa das crianças que participaram no estudo de *Joseph et al.* (2016).

1.2.5. Implicações de variações na sensibilidade gustativa nas escolhas alimentares e saúde

As diferenças individuais na capacidade de discriminar e perceber o gosto amargo despertou interesse na avaliação da relação entre essa capacidade e as escolhas alimentares. Apesar de alguns estudos não observarem diferenças entre indivíduos sensíveis e não-sensíveis ao composto PROP, no consumo de alimentos, tanto em adultos (*Martínez-Ruiz*, 2014), como em crianças (*O'Brien et al.*, 2013), outros têm proposto que o fenótipo PROP pode servir como marcador de sensações orais no geral, influenciando o comportamento alimentar e o estado nutricional (*Tepper*, 2008). Tem sido reportado que indivíduos supersensíveis para o PROP (*supertasters*) apresentam uma sensibilidade mais elevada a vários estímulos orais, comparativamente aos indivíduos não sensíveis (*nontasters*), incluindo compostos com gosto amargo, como chocolate negro, café, produtos à base de soja e chá verde (*Akella et al.*, 1997), alimentos doces, alimentos irritantes da cavidade oral e alimentos ricos em gordura (*Hayes & Duffy*, 2007). Outros estudos mostram que indivíduos que percebem o PROP como um composto extremamente amargo, apresentam uma aceitação diminuída de vegetais crucíferos, frutas amargas, alimentos picantes e bebidas alcoólicas (*Drewnowski et al.* 2000; *Sandell et al.*, 2014). Estudos com crianças reportam que crianças pouco sensíveis ao composto PROP apresentam maior consumo de vegetais com sabor amargo (*Bell & Tepper*, 2006), enquanto que crianças sensíveis a

este composto apresentam menor aceitação de alimentos como espinafres (Turnbull & Matisoo-Smith, 2002) e brócolos (Keller *et al.*, 2002).

Dada a importância nutricional dos lipídios numa dieta, a relação entre a sensibilidade ao PROP e a percepção e preferência por gordura também tem sido investigada. A maioria dos estudos (Duffy & Bartoshuk, 2000; Hayes & Duffy, 2007; 2008), mostraram que indivíduos não sensíveis para o PROP apresentam uma fraca capacidade para distinguir a gordura em alimentos mais gordurosos. Outro estudo demonstrou que crianças *nontasters* consomem mais alimentos ricos em gordura, comparativamente a crianças *tasters* (Keller & tepper, 2004). No entanto, existem diversos estudos que não observaram esta relação entre resposta para o PROP e sensibilidade para a gordura (Martínez-Ruiz *et al.*, 2014; O'Brien *et al.*, 2013).

1.2.5.1. Relação entre índice de massa corporal (IMC) e sensibilidade gustativa

A percepção gustativa, como influência no comportamento alimentar e, por conseguinte, no índice de massa corporal, tem sido estudada na tentativa de compreensão dos fatores que influenciam e determinam a obesidade. A maioria dos estudos enfatiza não só a relação entre a percepção do gosto doce e o IMC, mas também a relação entre a percepção do gosto amargo, particularmente a sensibilidade ao composto PROP, e a obesidade.

Diversos estudos têm associado a percepção gustativa à obesidade, enfatizando a relação com o gosto doce e com a gordura (Salbe *et al.*, 2004; Tepper & Seldner, 1999). Vários estudos têm sugerido que indivíduos obesos percebem o gosto doce como sendo menos intenso e demonstram preferência pelo mesmo (Bartoshuk *et al.*, 2006). Pelo contrário, Felsted *et al.* (2007) mostraram que indivíduos com IMC elevado, reportam menor prazer na ingestão de alimentos doces, em comparação com indivíduos com baixo IMC. Outros estudos não encontraram diferenças na percepção do gosto doce em indivíduos com diferente IMC (Anderson, 1995). Joseph *et al.* (2016), observou que, em crianças, o IMC não está relacionado com os limiares de deteção da sacarose, no entanto, crianças que apresentavam maior peso e maior largura de cintura, apresentavam limiares mais baixos para a sacarose.

A relação do IMC e a percepção do gosto doce foi também reportada como estando associado com o teor de gordura presente nos alimentos. Com efeito, a obesidade tem sido associada com dietas ricas em gordura e açúcar (Simchen *et al.*, 2006). A preferência por alimentos ricos em gordura pode ter maior influência no IMC

do que a preferência por alimentos doces. Por exemplo, mulheres obesas preferem alimentos menos doces, mas mais ricos em gordura, em comparação com mulheres normoponderais (Drewnowski *et al.*, 1985).

Outros estudos avaliaram a relação entre a sensibilidade para o PROP e o IMC, embora os resultados presentes na bibliografia não sejam consensuais. Com efeito, Tepper & Ullrich (2002) observaram uma associação inversa entre o fenótipo PROP e o IMC, sendo que indivíduos adultos pouco sensíveis a este composto, apresentaram IMC mais elevado. Por outro lado, raparigas sensíveis ao PROP apresentaram percentil de IMC mais elevado (Keller & Tepper, 2004).

1.3. Saliva

1.3.1. Principais características e funções

A saliva é um fluido composto por mais de 99 % de água. Esta é uma secreção mucoserosa ligeiramente acídica (pH entre 6 e 7), representando uma mistura complexa de fluidos provenientes de glândulas salivares maiores e de glândulas salivares menores e do fluido crevicular gengival, contendo bactérias orais e detritos de alimentos (Humphrey *et al.*, 2001). A saliva total é composta por uma variedade de eletrólitos, incluindo sódio, potássio, cálcio, magnésio, bicarbonato e fosfatos, por proteínas, como imunoglobulinas, enzimas (por exemplo amilase e lisozima), mucinas (glicoproteínas envolvidas na proteção e prevenção do epitélio oral), por enzimas microbianas e por produtos nitrogenados, como ureia e amónia. A proporção relativa dos diferentes componentes varia em função das alterações no fluxo salivar (Humphrey *et al.*, 2001). A saliva é uma secreção exócrina de células especializadas agrupadas em ácinos das glândulas salivares. As glândulas salivares são formadas durante o desenvolvimento embrionário por processos complexos e notavelmente dinâmicos que conduzem à arquitetura organizada e final de glândulas adultas normais (Harunaga *et al.*, 2011). Estas glândulas fazem parte do aparelho digestivo como glândulas anexas e encontram-se distribuídas pela cavidade oral (Douglas, 2002). De acordo com o seu tamanho e com o contributo em termos de quantidade total para a saliva, as glândulas salivares são classificadas em “maiores” e “menores”. Há três pares de glândulas salivares maiores: as parótidas, as submandibulares e as sublinguais (figura 1.9). As secreções destas glândulas ajudam a manter a cavidade oral húmida e iniciam o processo da digestão (Douglas, 2002). Nos mamíferos existem ainda outros tipos de glândulas,

glândulas salivares menores. Estas glândulas (estima-se entre 600 a 1000) existem como pequenas massas discretas que ocupam a submucosa na maior parte da cavidade oral. Os únicos locais onde elas não se encontram são a gengiva aderida, a face dorsal do terço anterior da língua e a porção do terço anterior do palato duro (Cate, 1998).

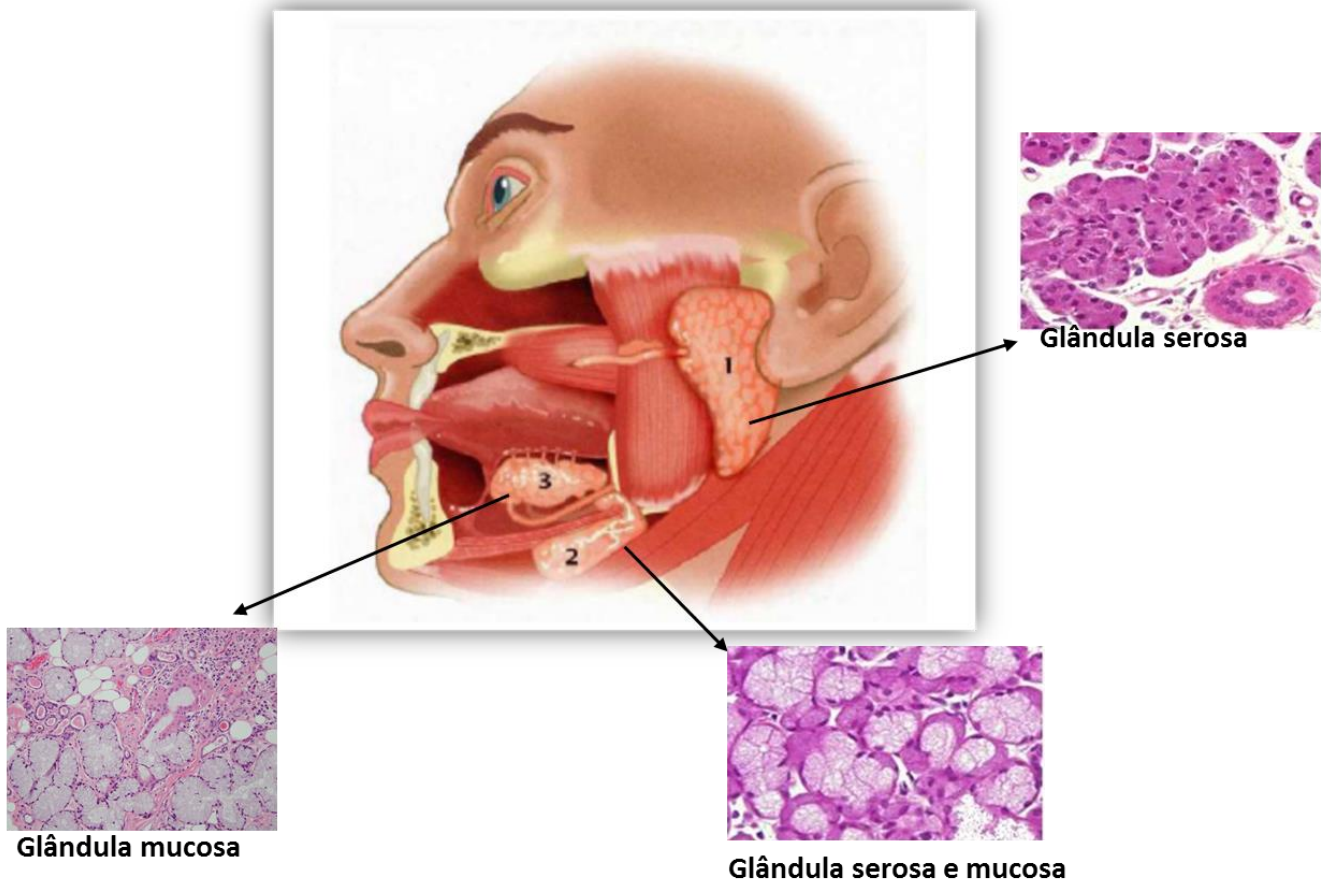


Figura 1.9- Localização anatômica das glândulas salivares maiores. 1–parótidas, 2-submandibulares, 3-sublinguais (adaptado de Aps & Martens, 2005).

No geral, a produção diária de saliva, em humanos pode variar de 800 e 1500mL (Aps *et al.*, 2005). Existem dois tipos principais de secreção salivar: secreção serosa e secreção mucosa. A primeira é uma secreção fluida rica em água, com enzimas e outras proteínas. Tem um papel importante na ingestão e na mastigação dos alimentos. É produzida e secretada pelas células acinares serosas das glândulas parótidas e de algumas glândulas salivares menores, como as glândulas de *Von Ebner*. Este tipo de secreção (e particularmente no caso da proveniente das glândulas parótidas) contém alguma atividade digestiva, nomeadamente a conferida pela proteína α -amilase. A

secreção mucosa é rica em glicoproteínas tais como mucinas, atuando preponderantemente na lubrificação e formação do bolo e deglutição. Este tipo de secreção deriva de células mucosas. Glândulas como as sublinguais e diversas glândulas salivares menores são constituídas na sua grande maioria (ou mesmo totalmente) por este tipo de células (Palamim, 1999; Schipper *et al.*, 2007). Pode ainda considerar-se um terceiro tipo de secreção, mista entre as duas referidas anteriormente, como é o caso da secreção proveniente das glândulas submandibulares, as quais são glândulas mistas, constituídas quer por ácinos serosos, quer mucosos (Figura 1.9).

A saliva é formada em duas fases: uma primeira que ocorre nos ácinos e uma segunda fase em que há uma modificação devido à passagem pelo sistema de ductos. A primeira secreção é formada ativamente pelo movimento dos iões sódio e cloreto para o lúmen acinar, dando origem a um gradiente osmótico que leva ao movimento passivo de água. Outros componentes acinares são aqui adicionados, antes do fluido entrar nos ductos. Nos ductos salivares os iões sódio são ativamente reabsorvidos e os iões potássio e bicarbonato são secretados e adicionados ao fluido final. Os componentes macromoleculares são formados no retículo endoplasmático das células acinares, processados em vesículas secretoras no complexo de Golgi e exportados para o exterior por exocitose (Harris *et al.*, 1998). Ainda que a maior parte das proteínas (cerca de 85%) seja secretada pelas células acinares, também há contribuição das células dos ductos para o total proteico da saliva (Vitorino *et al.*, 2004; Castagnola *et al.*, 2011). Os principais constituintes proteicos da saliva (em termos de percentagem no total de proteína da saliva) são amílases, PRPs (proteínas ricas em prolina), mucinas, cistatinas e imunoglobulinas (Figura 1.10).

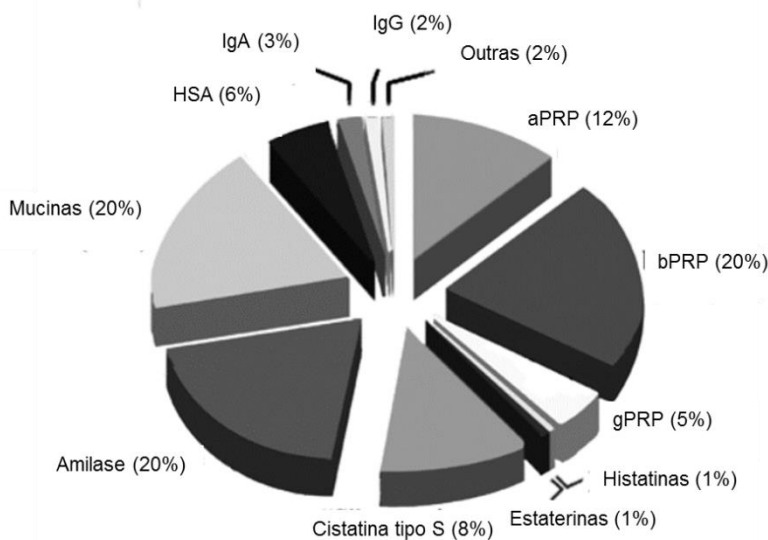


Figura 1.10- Constituintes proteicos da saliva (retirado de Scarano *et al.*, 2010).

Podem ser consideradas cinco funções principais da saliva: (1) lubrificação e proteção, (2) ação tamponizadora e atividade antibacteriana, (3) manutenção da integridade dos dentes, (4) reparação tecidual e (5) gosto e digestão (Humphrey *et al.*, 2001).

Como revestimento seromucoso, a saliva lubrifica e protege os tecidos orais. Os principais componentes lubrificantes da saliva são as mucinas salivares. As mucinas são glicoproteínas, têm propriedades de baixa solubilidade, elevada viscosidade e elasticidade e forte aderência. Mastigação, fala e deglutição são processos auxiliados pelo efeito lubrificante das mucinas. As mucinas desempenham também atividade antibacteriana através da modulação seletiva da adesão de microrganismos aos tecidos orais, contribuindo para o controlo da colonização bacteriana e fúngica (Humphrey *et al.*, 2001).

A ação-tampão da saliva deve-se principalmente à sua composição em bicarbonatos, fosfatos, ureia, proteínas anfotéricas e enzimas. O bicarbonato é o sistema tampão mais importante, neutralizando os ácidos. A capacidade tampão da saliva evita a colonização da boca por microrganismos potencialmente patogénicos, negando-lhes a otimização das condições ambientais. Além disso, a saliva contém um espectro de proteínas com propriedades antibacterianas, como é o caso da histatina e da lisozima, sendo esta última uma enzima que pode hidrolisar a parede celular de algumas bactérias (Carpenter, 2013).

A manutenção da integridade dos dentes é outra das funções desempenhadas pela saliva. Este fluido é saturado com iões cálcio e fosfato, garantindo as trocas iónicas

direcionadas à superfície dos dentes. Essa troca começa aquando da erupção do dente pois, embora a coroa esteja completamente formada do ponto de vista morfológico, nesse momento, ela é cristalograficamente incompleta. A interação com a saliva resulta em maturação pós-erupção através difusão de iões, como o cálcio, fósforo, magnésio e cloreto, para a superfície dos cristais de apatite do esmalte. Essa maturação aumenta a dureza da superfície, diminui a permeabilidade e aumenta a resistência do esmalte às cáries (Humphrey *et al.*, 2001).

No que diz respeito à percepção oral, a saliva também tem uma participação importante. Este fluido é necessário para dissolver as substâncias que são posteriormente transportadas até aos locais de receção/deteção do gosto (células recetoras do gosto localizadas nas papilas gustativas) (Humphrey *et al* 2001).

A secreção do fluido salivar é controlada pelas inervações simpática e parassimpática do sistema nervoso autónomo. Apesar das duas divisões do sistema nervoso autónomo controlarem de modo diferente a secreção de fluido e eletrólitos e a secreção de proteínas, na realidade, ao nível das glândulas salivares, a atividade de um dos ramos atua de forma sinérgica com o outro, potenciando o seu efeito (Emmelin, 1987). De uma forma muito simplificada, o sistema parassimpático (através da ação nos recetores muscarínicos e colinérgicos) está principalmente associado à secreção de fluido, e o sistema nervoso simpático (através da ação nos recetores β -adrenérgicos) à síntese e secreção proteica (Carpenter, 2013).

1.3.2. O papel da saliva na percepção oral

Tal como foi referido anteriormente, a percepção dos alimentos na cavidade oral é influenciada pela saliva. Este fluido afeta a percepção do gosto de diversos modos, nomeadamente através da dissolução e transporte das moléculas presentes nos alimentos para os locais de receção do gosto e por interações entre os constituintes da saliva e as moléculas dos alimentos (Salles *et al.*, 2010).

As proteínas salivares apresentam como particularidade o facto de interagirem com os constituintes dos alimentos, alterando as características táteis dos mesmos. O envolvimento das proteínas salivares na percepção dos alimentos tem sido mais estudado devido ao seu efeito no desenvolvimento da sensação de adstringência. Foram consideradas duas teorias para explicar a sensação de adstringência. A primeira defende que a adstringência se desenvolve devido à precipitação de proteínas salivares por substâncias adstringentes, e esses precipitados são percebidos na cavidade oral

(de Wijk *et al.*, 2006). Por outro lado, há autores que defendem que a sensação de adstringência é o resultado de modificações nas propriedades viscoelásticas de proteínas glicosiladas, resultando na ruptura do filme salivar lubrificante da cavidade oral (Rossetti *et al.*, 2008; Schwarz & Hofmann, 2008). Nayak & Carpenter (2008) sugeriram que o desenvolvimento da adstringência ocorre em duas fases: uma primeira em que os polifenóis (ou outras moléculas adstringentes) se ligam às proteínas da “fase líquida” da saliva para as quais têm maior afinidade. Seguidamente, as moléculas adstringentes que não se ligaram, podem interagir com a camada de glicoproteínas adsorvidas, diminuindo a lubrificação da cavidade oral e desenvolvendo adstringência.

Diversas proteínas salivares têm sido consideradas como estando envolvidas na adstringência provocada por polifenóis, devido à sua afinidade para estes compostos: PRPs (Williamson, 1994), histatinas (Yan & Bennick, 1995), estaterinas e cistatinas (Soares *et al.*, 2012) e mesmo amilase (de Freitas & Mateus, 2002). Entre estas, as PRPs salivares têm sido as proteínas mais estudadas em termos de interação com polifenóis, sendo consideradas a principal família de proteínas envolvidas na adstringência. As PRPs apresentam uma estrutura que lhes confere elevada afinidade para a ligação a taninos (Canon *et al.*, 2010). As mucinas também apresentam um papel na adstringência, embora existam algumas controvérsias a este respeito. Estudos desenvolvidos por McColl *et al.* (2009), apresentam evidências que as mucinas têm um reduzido efeito de lubrificação quando misturadas com taninos. Por outro lado, outros estudos (Lee *et al.*, 2012) observaram que essas proteínas são precipitadas por alumínio e ácido, mas não por polifenóis, sugerindo um envolvimento diferente de acordo com o tipo de molécula adstringente.

Há outras proteínas que também foram referidas como estando potencialmente envolvidas na percepção oral. A proteína Lipocalina 1, presente na saliva humana proveniente das glândulas de Von Ebner (Spielman *et al.*, 1993), apresenta homologia com transportadores de moléculas hidrofóbicas, tendo sido proposto que as mesmas podem auxiliar na concentração e transporte de moléculas gustativas para as células especializadas do gosto (Schmale *et al.*, 1990).

As mucinas, glicoproteínas de elevado peso molecular, além de apresentarem propriedades viscoelásticas que promovem a lubrificação do bolo alimentar (Pedersen *et al.*, 2002), participam também na percepção da textura dos alimentos (Vingerhoeds *et al.*, 2005, Mese and Matsuo, 2007).

A principal enzima digestiva da saliva é a α -amilase, estando esta presente, em humanos, na saliva da parótida em concentrações de 60-120mg/100mL, e na saliva da

submandibular em concentrações de aproximadamente 25mg/100mL (Harris *et al.*, 1998). É uma proteína existente na saliva com diferentes isoformas (entre as quais isoformas glicosiladas), com massas moleculares aparentes que podem variar entre 55 e 67KDa (Hirtz *et al.*, 2005; da Costa *et al.*, 2008). A α -amilase desempenha a sua principal função no processo inicial da digestão, hidrolisando a ligação glicosídica α -1:4 entre as unidades de glucose na cadeia de polissacarídeos de amido. A hidrólise ocorre em qualquer local ao longo da cadeia. Os produtos finais da digestão da amilase são principalmente maltose, juntamente com oligossacarídeos bem como alguns níveis de bicarbonato (Harris *et al.*, 1998). O possível envolvimento desta proteína na percepção das propriedades sensoriais de alimentos foi já sugerido por diversos autores, nomeadamente pela influência na viscosidade percebida de amido (Mandel *et al.*, 2010) e na textura de alimentos semi-sólidos (Engelen *et al.*, 2007). Há ainda um estudo recente que refere a presença de recetores de gosto nas células acinares e ductais das glândulas salivares, e que sugere uma possível regulação da secreção de amilase por parte destes (Dasso *et al.*, 2011). A confirmar-se esta regulação, este facto ajuda a reforçar a existência de uma inter-relação entre a expressão de amilase salivar e a percepção gustativa.

Os níveis de expressão desta proteína dependem de diversos fatores, como os hábitos alimentares (Perry *et al.*, 2007), percepção de saciedade (Harthoom *et al.*, 2007) e atividade do ramo simpático do sistema nervoso autónomo (Miller *et al.*, 2010). Estudos realizados por Gidez (1973) em roedores mostram que uma dieta rica em amido leva a um aumento dos níveis de amilase. Por outro lado, uma dieta rica em gordura faz com que os níveis de amilase aumentem significativamente, quando comparados com os níveis de amilase de ratinhos alimentados com uma dieta pobre em gordura (Rodrigues *et al.*, 2015).

A percepção do gosto tem sido relacionada com a proteína salivar CA-VI desde há diversos anos. Henkin *et al.* (1971), observaram que indivíduos com défice desta proteína apresentam uma anatomia anormal dos gomos gustativos. Além disso, esta proteína foi observada em níveis diminuídos na saliva da parótida de pacientes com disfunções do gosto (Shatzman & Henkin, 1981). Diversos estudos têm sugerido que a proteína CA VI atua como fator trófico, promovendo o crescimento e o desenvolvimento das papilas gustativas (Henkin *et al.*, 1999). Além disso, esta proteína apresenta uma ação anti-apoptótica nos gomos gustativos através da regulação do pH local (Leinonen *et al.*, 2001). No que diz respeito ao fenótipo PTC/ PROP, alguns estudos relacionam-no com esta proteína. Em 2010, Padiglia *et al.*, ainda que não tenham observado diferenças na quantidade de CA-VI entre indivíduos sensíveis e não sensíveis para o PROP, observaram alterações na capacidade de ligação ao zinco, por parte desta

proteína, o que condiciona a sua função, a qual parece ser determinada por polimorfismos genéticos. Cabras *et al.*, (2012) também observaram que diferentes polimorfismos no gene que codifica a proteína CA-VI (rs2274333 (A/G)) alteram o funcionamento desta enzima, o que observaram como estando fortemente relacionado com a resposta ao PROP. No entanto, tem-se verificado alguma controvérsia acerca da influência desta proteína na percepção do gosto amargo, sendo que estudos recentes não observaram esta relação (Feeney & Hayes, 2014).

O Fator de Crescimento Epidérmico (EGF), secretado pelas glândulas parótida e submandibular, tem sido relacionado com a manutenção da integridade morfológica dos gomos gustativos. Em ratos, a remoção das glândulas salivares maiores altera a morfologia dos gomos gustativos das papilas fungiformes, no entanto, a administração oral de EGF restaura a normal morfologia dos mesmos (Morris-Wiman *et al.*, 2000).

Wada *et al.* (2010) mostraram que a concentração de histatina 5 é significativamente menor em indivíduos supersensíveis ao gosto amargo do quinino, tendo sido também demonstrado que estas proteínas têm capacidade de ligação a este composto. Deste modo, indivíduos com menor concentração de histatina 5, apresentam mais quinino livre, o qual pode interagir com os recetores do gosto, aumentando a sensibilidade ao mesmo. Outro exemplo da interação entre proteínas salivares e moléculas sápidas, foi demonstrada por Melis *et al.* (2013). Neste caso, a molécula PROP interage com os aminoácidos arginina e lisina. Esta investigação está de acordo com os resultados obtidos por Cabras *et al.* (2012), no qual a análise de saliva de indivíduos *supertasters* e *nontasters* revelou níveis mais elevados de PRPs na saliva de indivíduos *supertasters*, em particular de Ps1, proteína que contém uma elevada proporção de arginina e lisina. Neste caso particular, a ligação destes aminoácidos ao PROP pode conferir à molécula uma nova conformação, podendo facilitar a ligação ao recetor do gosto. Watanabe *et al.* (2005), observaram uma diminuição da expressão da proteína metalloproteinase 3 (MMP-3) na saliva de indivíduos que apresentam distúrbios ao nível do gosto, tendo esta proteína sido associada à regeneração contínua do paladar (Watanabe *et al.*, 2005).

A relação entre a composição da saliva e a percepção de gordura também foi sugerida, num estudo recente. Nesse estudo a proteína salivar zinco- α -2glycoproteína (ZAG) foi observada como estando mais expressa em indivíduos supersensíveis ao gosto do ácido oleico, tendo sido sugerido que a ZAG possa atuar como solubilizante do ácido oleico na saliva (Mounayar *et al.*, 2014).

Através da utilização de técnicas de eletroforese bidimensional, a proteína Cistatina SN foi identificada como estando diferencialmente expressa entre grupos de sensibilidade ao gosto amargo da cafeína (Dsamou *et al.*, 2012). Recentemente, a separação de proteínas da saliva mista de crianças de 3-6 meses de idade, revelou diferenças nos perfis proteicos relacionadas com a aceitação do gosto amargo. Com efeito, verificou-se uma expressão elevada de zinco- α -2-glicoproteína e CA-VI em crianças com baixa aceitação para o gosto amargo, enquanto que crianças com elevada aceitação para o mesmo gosto apresentavam uma expressão elevada de lactoperoxidase, cistatina tipo S e proteína induzida por prolactina (Morzel *et al.*, 2014; Mounayar *et al.*, 2014). Também as proteínas salivares HSP70 foram identificadas como desempenhando um papel importante na manutenção das células do gosto e dos recetores do gosto umami (Fábián *et al.*, 2009).

Outro parâmetro que pode influenciar a percepção oral é a taxa de fluxo salivar, a qual pode modificar a concentração oral das moléculas do gosto, devido ao seu efeito de diluição. Também a composição iónica da saliva parece poder influenciar os limiares de deteção do gosto e os mecanismos de transdução de sinal relacionados com a percepção gustativa, podendo levar à produção de potenciais intracelulares mais lentos nas células do gosto e, conseqüentemente, a alterações gustativas (Fabián *et al.*, 2015). Por exemplo, os níveis de Na⁺ salivares vão influenciar a percepção de salgado: níveis salivares mais elevados deste ião resultam em limiares de deteção de salgado mais elevados, possivelmente por uma dessensibilização dos recetores do gosto (Matsuo, 2000).

A ação da saliva e dos componentes salivares ao nível da percepção dos alimentos, encontra-se esquematizada na figura 1.11.

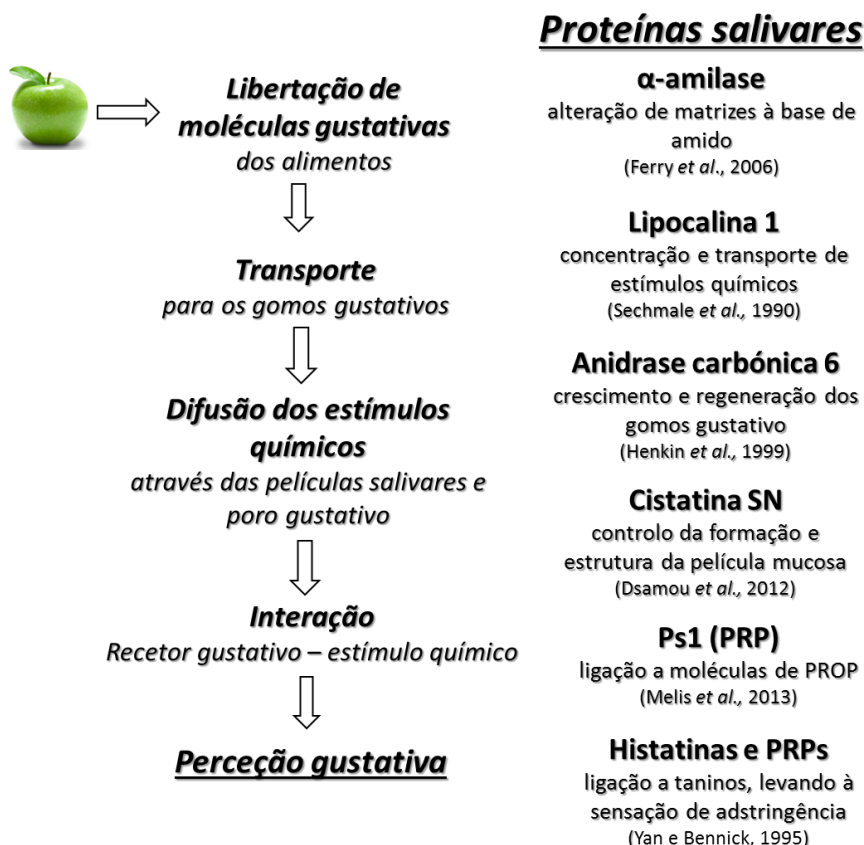


Figura 1.11- Esquema representativo da ação da saliva na percepção dos alimentos. Exemplos de proteínas salivares envolvidas na função gustativa (adaptado de Lamy *et al.*, 2015).

1.3.3. Utilização da proteómica no estudo da saliva

O conceito *Proteómica* foi introduzido por Marc Wilkins, em 1995, sendo definido como a caracterização em grande escala da totalidade de proteínas de uma linha celular, tecido ou organismo (Wilkins *et al.*, 1996). A proteómica tem como objetivo o estudo sistemático da estrutura das proteínas, função, modificações e interações dinâmicas (Jensen, 2006, Carrera *et al.*, 2016).

Dependendo do objetivo do estudo, a proteómica pode ser utilizada para identificar e caracterizar uma proteína específica, estudar variações ao nível do proteoma em resultado de um estímulo ou estudar interações funcionais entre proteínas diferentes (Carrera *et al.*, 2016).

A partir do início do século XXI, com a combinação de avanços nas técnicas de separação de proteínas, de tecnologias baseadas na espectrometria de massa e de

ferramentas bioinformáticas, houve avanços consideráveis no estudo do proteoma, incluindo-se aqui também avanços significativos no estudo do proteoma salivar (Amado *et al.*, 2013).

A análise quantitativa e qualitativa do proteoma da saliva tornou-se interessante, não apenas a nível de investigação fundamental, mas também como fluido contendo potenciais biomarcadores para diagnóstico de diversas patologias, não só orais, como também sistémicas. A presença de vários analitos na saliva, em quantidades relacionadas com o sangue, em conjunto com o facto deste fluido poder ser recolhido de forma simples e não invasiva, mesmo por pessoas pouco treinadas, está na base deste crescente interesse pelo estudo da saliva.

A caracterização de diversas proteínas salivares e o conhecimento que hoje existe acerca deste fluido deve-se à utilização conjunta de metodologias diversas. Na realidade, a totalidade do proteoma não consegue ser conhecida através da utilização de uma só abordagem e é a combinação de várias que possibilita um conhecimento mais completo (Yao *et al.*, 2003; Hardt *et al.*, 2005). No caso particular da saliva, e à semelhança do que acontece noutros fluidos como o sangue, para se conseguir aceder a proteínas menos abundantes poderá ser necessário “limpar” a amostra das proteínas muito abundantes (ex. amílase), o que pode ser conseguido através de diversas técnicas de fracionamento (Bandhakavi *et al.*, 2009).

Uma das características do proteoma salivar é apresentar proteínas que estão presentes em diferentes formas, com diferentes massas moleculares e/ou diferentes pontos isoelétricos (*pI*), muitas vezes devido a proteólise ou modificações pós-traducionais (PTMs). As PTMs ocorrem durante o processo de síntese proteica, no momento de formação da cadeia polipeptídica, e podem ocorrer por clivagem proteolítica ou por adição de um grupo químico a um ou mais aminoácidos. Estas modificações podem determinar a atividade, a localização, e interações com outras proteínas. Até ao momento, têm sido reportadas diversos tipos de modificações, entre as quais fosforilações e glicosilações (Temporini *et al.*, 2008). A existência de diversas PTMs na amílase salivar foi referida por Hirtz *et al.* (2005), as quais foram sugeridas como podendo estar associadas a alterações na função desta proteína. Estes autores observaram vários *spots* de α -amilase salivar: uns com diferente *pI* e massa molecular mais elevada, podendo resultar de glicosilações nesta proteína e outros com menor massa molecular, provavelmente devido a processamento proteolítico. Os autores colocaram a hipótese de que estas modificações podem conduzir a diferenças em termos de atividade enzimática (Hirtz *et al.*, 2005).

A análise das modificações pós-traducionais representa um desafio na investigação proteómica. O princípio geral para a identificação de uma proteína ou de

modificações pós-traducionais de uma proteína por espectrometria de massa consiste na comparação do espectro de massa obtido experimentalmente com um espectro de massa de uma base de dados de uma proteína conhecida (Govorun & Archakov, 2002). Modificações pós-traducionais e processamento de uma proteína conduzem a um aumento ou diminuição na massa, relativamente ao peso molecular calculado a partir da sequência de aminoácidos não modificados da proteína (Temporini *et al.*, 2008). Normalmente, essas modificações conseguem ser detetadas. Em regra, os programas para a identificação de proteínas através dos seus espectros de massa usam bases de dados que contém sequências de aminoácidos das proteínas e sequências de nucleótidos de genes. A SWISS-PROT é uma base de dados que possui sequências de proteínas, o seu domínio estrutural, modificações pós-translacionais, entre outras; a TrEMBL é um complemento para a SWISS-PROT, que contém todas as sequências das proteínas; a PIR-International é também uma base de dados de sequências de proteínas; NCBIInr é uma base de dados que contém sequências traduzidas a partir de sequências de ADN de um banco de Genes (GeneBank) e também contém sequências das bases de dados de SWISS-PROT e PIR. (Veeser *et al.*, 2001).

1.3.3.1. Técnicas de separação proteica

Várias técnicas de proteómica permitem a separação de proteínas, podendo as mesmas ser baseadas em gel ou não. As técnicas de separação proteica baseadas em gel são as técnicas de eletroforese uni- e bi-dimensional, enquanto que como técnicas “não baseadas” em gel temos a cromatografia líquida uni- e bi-dimensional. Estas técnicas são normalmente acopladas a espectrometria de massa e ferramentas bioinformáticas para identificação das proteínas separadas.

A eletroforese é uma técnica de separação baseada na migração das moléculas carregadas, numa solução, em função da aplicação de um campo elétrico. A escolha do método eletroforético depende dos objetivos do estudo e das proteínas salivares de interesse. A separação das proteínas, por eletroforese, de acordo com as suas massas moleculares é feita por SDS-PAGE (eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecilsulfato de sódio). Nesta técnica a amostra é misturada com um tampão contendo o detergente SDS, que confere carga negativa às proteínas em função do seu número de aminoácidos. Assim, a carga negativa conferida é proporcional à massa molecular das proteínas. Esta técnica apresenta como vantagens o fato de permitir a separação de proteínas com massas moleculares relativamente elevadas (de 10000 a 300000Da), a possibilidade de visualização de proteínas extremamente ácidas e

básicas e o fato de ter pouca sensibilidade para a concentração de sais. No entanto, a separação de proteínas baseada apenas na sua massa molecular limita a informação obtida, uma vez que cada banda presente neste tipo de gel é constituída por diferentes proteínas (Rabilloud *et al.*, 2010).

A técnica de focagem isoeétrica (IEF) baseia-se nas diferenças dos pontos isoeletricos das proteínas para as separar. As proteínas possuem uma carga nativa que pode ser positiva, negativa ou nula dependendo do pH do meio, sendo que para cada proteína existe um valor de pH do meio para o qual a carga da mesma é 0 (*pI*, ponto isoeletrico), que geralmente se situa entre 3–12. Nesta técnica, o gel tem um gradiente de pH, o qual é estabelecido pela mistura de anfólitos. Quando a mistura proteica é aplicada num gel desta natureza, mediante a passagem de um campo elétrico, as proteínas migram em função da sua carga nativa, sendo que à medida que ocorre essa migração, através do gradiente de pH, cada proteína irá captar ou perder prótons. Enquanto a proteína migra a sua velocidade vai diminuindo até chegar ao ponto em que o valor de pH será igual ao seu *pI*. Neste ponto a proteína terá carga total neutra e como consequência cessa a migração. Se a proteína se difundir para uma região fora do seu *pI*, irá adquirir carga e conseqüentemente move-se novamente para a posição onde é globalmente neutra. Pode ter grupos ionizados, mas globalmente é neutra (Friedman *et al.*, 2009).

Apesar dos avanços no conhecimento da composição proteica da saliva que as técnicas SDS-PAGE e IEF têm permitido, o desenvolvimento de 2-DE e a sua aplicação no estudo da saliva contribuiu para um grande avanço na compreensão deste fluido. A eletroforese bidimensional é uma das técnicas mais utilizadas no estudo do proteoma, permitindo a separação de um grande número de proteínas consideravelmente diferentes, em gel de poliacrilamida. A eletroforese bi-dimensional foi introduzida em 1975 (O'Farrell, 1975) e o seu princípio baseia-se na separação das proteínas com base em duas propriedades em simultâneo: a sua massa molecular e ponto isoeletrico. Esta técnica tornou-se muito útil no estudo de misturas complexas de proteínas, como a saliva, pois, além da elevada capacidade de separação, tem ainda a vantagem de mapeamento de modificações pós-traducionais, permitindo a sua quantificação separada. Como muitas proteínas salivares apresentam diferentes isoformas, algumas relacionadas com a sensibilidade gustativa, tornou-se essencial esta comparação individual de isoformas (Rabilloud *et al.*, 2010).

Péptidos e proteínas salivares podem também ser analisados por Eletroforese Capilar (CE). Esta técnica é um método de separação, realizado em capilares, nos quais os analitos migram através de uma solução de eletrólitos, sob a influência de um campo elétrico. A velocidade eletroforética do analito depende da magnitude do campo elétrico

e da sua mobilidade eletroforética (Spudeit, *et al.*, 2012). Esta técnica apresenta como vantagem o facto de permitir trabalhar com um pequeno volume de amostra e realizar análises de elevada resolução. Além disso, permite a separação de moléculas de baixa massa molecular e/ou de carga neutra (Petersen *et al.*, 2003). Os tipos de CE que apresentam maior potencial em proteómica (normalmente usados conjuntamente com espectrometria de massa) são Eletroforese Capilar de Zona e Focagem Isoelétrica Capilar. O uso de CE na análise do proteoma da saliva tem permitido a caracterização e identificação de várias proteínas salivares (Lloyd *et al.*, 2008).

Um dos grandes avanços na abordagem proteómica baseada em gel foi o aparecimento da eletroforese DIGE (*2D differential gel electrophoresis*). Esta técnica, introduzida por Unlu *et al.* (1997) usa a marcação direta das proteínas, com marcadores fluorescentes (*CyDyes*: Cy2, Cy3 e Cy5), os quais ligam, de forma covalente, os grupos ϵ -amina do aminoácido lisina, que está presente nas proteínas. Estes diferentes *CyDyes* permitem que três amostras diferentes possam correr em simultâneo no mesmo gel, resultando depois em spots de cores diferentes consoante o filtro fluorescente utilizado durante a revelação do gel. A variabilidade inerente à técnica, que tem que ser considerada na comparação de géis obtidos por eletroforese bi-dimensional, de forma clássica, é contornada através da utilização de DIGE.

Apesar das vantagens da utilização de técnicas eletroforéticas no estudo da composição proteica da saliva, este fluido apresenta particularidades que devem ser consideradas e que podem limitar o uso destas técnicas. Uma dessas particularidades é o considerável teor em iões e sais da saliva, os quais podem causar interferências na separação, particularmente no caso da focagem isoelétrica, uma vez que esta ocorre de acordo com a carga elétrica. A redução de iões e sais pode ser conseguido através da ultracentrifugação da amostra em membranas ou através da precipitação ácida de proteínas, sendo que ambos os procedimentos aumentam a concentração proteica da amostra (Lamy *et al.*, 2015). Outra característica da saliva que limita o estudo deste fluido por técnicas eletroforéticas é a considerável quantidade de mucinas presentes. A elevada massa molecular destas proteínas impede-as de migrar através do gel de poliacrilamida, resultando na sua deposição no topo do gel. No entanto, este problema pode ser contornado através da centrifugação da saliva, ficando as mucinas depositadas no precipitado, o qual é posteriormente removido, ainda que isso implique perdas de outras proteínas (Francis *et al.*, 2000; Schipper *et al.*, 2007). Além das limitações referidas, também o facto da saliva conter importantes analitos de baixa massa molecular, pode limitar a utilização desta técnica, uma vez que os mesmos não são separados por técnicas eletroforéticas (Lamy *et al.*, 2015). Por outro lado há desvantagens/limitações no estudo de proteomas baseado em eletroforese bi-

dimensional transversais aos diversos tipos de amostra, como é o caso da impossibilidade de aplicação desta técnica a proteínas com massas moleculares muito elevadas ou muito baixas, a proteínas presentes em quantidades muito reduzidas (que são difíceis de visualizar mesmo com colorações mais sensíveis, como o nitrato de prata ou corantes fluorescentes), ou a proteínas de membrana, muito hidrofóbicas (Rodríguez-Suarez *et al.* 2012).

Algumas das limitações da separação proteica em gel podem ser contornadas através de métodos de separação que não se baseiam na utilização de géis, como é o caso da cromatografia líquida. As proteínas podem ser separadas com base numa única característica (1D-LC), como por exemplo massa, carga ou hidrofobicidade, ou com base em duas características (2D-LC). Neste segundo caso, as proteínas são separadas primeiro de acordo com a sua carga nativa (ponto isoelétrico) e em seguida numa segunda dimensão, pelas suas características de hidrofobicidade. (Guo *et al.*, 2007; Matt *et al.*, 2008). A cromatografia líquida apresenta a vantagem de conseguir separar proteínas que não podem ser separadas em gel, pelos motivos referidos anteriormente, e proteínas pouco abundantes.

1.3.3.2. Espectrometria de massa

Após a separação das proteínas em gel, ou em meio líquido, as mesmas podem ser identificadas por Espectrometria de massa (MS). Nesta técnica, as moléculas são convertidas em iões em fase gasosa, os quais são separados no espectrómetro de massa de acordo com a sua razão massa-carga (m/z).

Uma das abordagens mais comuns, no caso da separação das proteínas em gel é cortar as bandas/*spots* de interesse e fazer a digestão *in-gel* com uma protease (normalmente tripsina), sendo os péptidos resultantes analisados por MS e identificados. Esta abordagem é denominada *bottom-up*, por oposição à abordagem *top-down*, que consiste em injetar proteínas intactas no espectrómetro de massa. A abordagem *bottom-up* inclui três estratégias para a identificação proteica: *peptide mass fingerprinting* (PMF), *peptide fragment fingerprinting* (PFF) e sequência *de novo* (Tanaka *et al.*, 2009). No caso de PMF, o rácio massa/carga obtido para cada um dos péptidos é comparado com as listas de massas teóricas existentes nas bases de dados obtidas por digestão *in silico* (com o mesmo tipo de enzima utilizado na amostra) (Henzel *et al.*, 2003). No caso de PFF, as identificações fazem-se com base nos fragmentos resultantes de espectrometria de massa *tandem* (MS/MS) para péptidos selecionados e as massas comparadas com as massas teóricas, existentes nas bases de dados. Para que este tipo de identificação seja possível é necessário o recurso a *softwares* como o

MASCOT (por exemplo), que são ferramentas de pesquisa, que comparam os dados obtidos com os existentes nas bases de dados de proteínas e nucleótidos (Dakna *et al.*, 2009). As bases de dados mais usadas neste tipo de análise de resultados são: SWISS-PROT, TrEMBL, PIR-International (*Protein Identification Resource*, National Biomedical Research Foundation, Washington, USA), NCBI nr (*National Center of Biotechnological Information*) e ESTdb (*Expressed Sequence Tags database*, NCBI, NIH).

Os espectrómetros de massa são constituídos por três componentes básicos: (1) fonte de iões, onde as moléculas são convertidas em iões na fase gasosa, (2) analisador de massa, onde os iões são separados com base na sua razão massa-carga (m/z) e (3) detetor de iões, onde os iões são detetados (Yates, 2005).

Duas das técnicas de ionização mais usadas são o MALDI (ionização/desorção a laser assistida por matriz) e ESI (ionização por *electrospray*).

MALDI é um dos métodos de espetrometria de massa mais eficientes para análise de compostos com elevada massa molecular, em particular proteínas e outras biomoléculas com massa superior a 700 Da (Desiderio & Nibbering, 2001). A análise por espetrometria de massa com MALDI ocorre em dois passos: no primeiro passo, o composto a ser analisado é dissolvido num solvente contendo em solução pequenas moléculas orgânicas, chamadas de matriz. Esta mistura é seca antes da análise e qualquer solvente líquido usado na preparação da solução é removido. O resultado é o depósito de uma solução sólida. O segundo passo ocorre sob condições de vácuo no interior da fonte do espectrómetro de massa (Knochenmuss, 2002). A irradiação por laser induz o rápido aquecimento dos cristais pela acumulação de grandes quantidades de energia na fase condensada através da excitação das moléculas da matriz (Dreisewerd, 2003).

Este método apresenta como vantagens o facto de ter uma elevada sensibilidade, permitindo a análise de biomoléculas intactas e possibilitar a análise de misturas sem purificação prévia. A técnica de ionização MALDI é mais sensível do que as outras técnicas de ionização por laser. O número de moléculas da matriz excede largamente as do analito, separando assim as moléculas do analito e prevenindo a formação de clusters que possam inibir o aparecimento de iões moleculares. A matriz também minimiza danos na amostra a partir do feixe de laser por absorção de energia incidente e aumenta a energia de transferência a partir do feixe de laser para o analito (Spengler & Cotter 1990). A matriz mais usada para a análise de péptidos mais pequenos é o ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (Hajduk *et al.*, 2016).

A técnica de ESI é principalmente utilizada na análise de compostos não voláteis, tais como proteínas e macromoléculas. Esta técnica envolve a formação de um *spray* eletrostático, a partir do qual são geradas pequenas gotas eletricamente carregadas das

moléculas em análise dissolvidas no solvente. Estas gotas entram numa câmara de vácuo onde o solvente é evaporado. A evaporação do solvente reduz o tamanho da gota, aumentando a repulsão coulombiana dentro da mesma, resultando na formação de gotas cada vez menores. Como as gotas se tornam cada vez menores, a carga excessiva no seu interior faz com que as mesmas se desintegram e libertem iões. Os iões volatilizados são posteriormente analisados por espetrometria de massa. Moléculas grandes, como as proteínas, adquirem múltiplas cargas no processo de ionização. Essa característica possibilita que moléculas grandes possam ser analisadas pelos espetrómetros de massas que em geral trabalham na faixa de massa máxima de 2000 a 3000Da (Ho *et al.*, 2003).

1.3.3.3. Utilização da proteómica salivar na perceção oral e estudos sobre escolhas alimentares

Apesar do elevado número de estudos de proteómica salivar na área da saúde, o estudo do proteoma saliva relacionado com a perceção oral e as escolhas alimentares, em humanos, tem recebido menos atenção.

No caso particular da perceção de adstringência, diferentes estudos, em animais (da Costa *et al.*, 2008; Lamy *et al.*, 2010; Lamy *et al.* 2011) e humanos (Dinnella *et al.*, 2009; 2010) recorreram às técnicas SDS-PAGE e 2-DE para comparar perfis proteicos salivares antes e depois da ingestão de alimentos ricos em taninos e identificar proteínas salivares que interagem com esses compostos. No que diz respeito à perceção oral, estudos de Dinella *et al.* (2009; 2010), apresentaram evidências de que indivíduos sensíveis à sensação de adstringência apresentavam alterações no perfil proteico salivar após a estimulação com tanino.

Também foram observadas alterações no proteoma salivar após a estimulação gustativa, sendo essas diferenças dependentes do estímulo gustativo utilizado (Neyraud *et al.*, 2006), o que sugere diferentes adaptações da saliva aos cinco gostos básicos. Considerando o gosto amargo, a utilização destas técnicas tem contribuído para os avanços no conhecimento acerca da relação entre as proteínas salivares e a perceção deste gosto. Por exemplo, a proteína Cistatina SN foi identificada, por 2D-E, como estando diferentemente expressa entre grupos de sensibilidade ao gosto amargo da cafeína (Dsamou *et al.*, 2012). Além disso, a separação de proteínas, por SDS-PAGE, na saliva de crianças com três meses de idade, mostrou diferenças nos perfis salivares relacionados com a aceitação para o amargo, constatando-se uma elevada quantidade de Zinco- α -2-glicoproteína e CA-VI na saliva de crianças com baixa aceitação deste

gosto. Por outro lado, a saliva de crianças que demonstraram elevada aceitação para o amargo, apresenta elevada abundância de lactoperoxidase, cistatina tipo S e proteína induzida por prolactina (Mounayar *et al.*, 2013; Morzel *et al.*, 2014).

Para além de técnicas de eletroforese, o proteoma salivar foi relacionado com a resposta para o composto PROP por técnicas de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa. Cabras *et al.* (2012) separaram as proteínas salivares de indivíduos sensíveis e pouco sensíveis ao PROP por cromatografia líquida de alta performance (HPLC)-ESI, sendo as proteínas separadas identificadas por espectrometria de massa. Através deste estudo foram observados maiores níveis de expressão de uma proteína da família das PRPs básicas em indivíduos sensíveis ao PROP, sendo sugerido o envolvimento desta proteína nos mecanismos envolvidos na percepção deste composto (Melis *et al.*, 2013).

Capítulo 2

Objetivos

De acordo com a revisão da bibliografia, apresentada no capítulo anterior, acerca da relevância que a percepção gustativa pode ter na aceitação e escolha dos alimentos e dos mecanismos envolvidos na mesma, onde a saliva poderá ter um papel, o objetivo geral do presente trabalho consistiu na avaliação da relação entre a composição da saliva e a sensibilidade gustativa.

De forma a atingir este objetivo geral, foram delineados estudos com objetivos específicos que se encontram detalhados em seis dos capítulos da presente dissertação.

Capítulo 4

Tendo em conta a relevância que o fenótipo de resposta para o composto 6-n-propil-tiouracil (PROP) tem, em termos de parâmetro utilizado em estudos nutricionais, para avaliação da influência da percepção oral nos hábitos alimentares e, por conseguinte, no desenvolvimento de patologias associadas, o objetivo deste capítulo foi comparar a composição proteica da saliva de indivíduos com diferentes respostas para o gosto amargo do PROP e identificar as proteínas salivares potencialmente envolvidas na resposta ao gosto amargo deste composto, em adultos jovens portugueses.

Capítulo 5

O objetivo do estudo apresentado no capítulo 5 foi avaliar a relação entre a sensibilidade para o gosto doce e a composição salivar, quer em termos de proteoma, quer em termos de níveis de glucose, uma vez que esta última estimula os recetores do gosto doce. Esta avaliação foi feita para os mesmos indivíduos estudados relativamente à resposta ao amargo, no capítulo 4.

Capítulo 6

De modo a poder avaliar até que ponto os resultados obtidos acerca da relação entre saliva e gosto poderão ser importantes no contexto das preferências e escolhas alimentares, este capítulo teve como objetivo estudar a existência de relação entre a sensibilidade para os gostos estudados ao longo da presente tese (doce e amargo) e as preferências por diferentes alimentos. Este estudo foi realizado com crianças de 8-9

anos de idade, onde o percentil de Índice de Massa Corporal (IMC) foi um parâmetro tido em conta, por ser um parâmetro associado ao comportamento alimentar.

Capítulo 7

Neste capítulo, à semelhança dos capítulos 4 e 5, o objetivo foi avaliar a relação entre a composição da saliva e a sensibilidade para os gostos amargo e doce, mas desta vez em crianças e, se essa relação, a existir, é influenciada pelo percentil de IMC.

Capítulo 8

Neste capítulo colocou-se a hipótese da sensibilidade gustativa poder estar relacionada com parâmetros salivares potenciais indicadores de estados emocionais/*stress*. Devido à inconsistência de alguns resultados existentes na literatura acerca da relação entre os níveis de cortisol em crianças saudáveis e com obesidade, o objetivo deste capítulo consistiu em avaliar a existência de relação entre as sensibilidades para os gostos doce e amargo e os níveis de cortisol e α -amílase salivares, e, a existir, se essa relação difere entre crianças normoponderais e crianças com excesso de peso/obesidade.

Capítulo 9

Devido ao facto de estudos recentes apontarem a leptina como estando potencialmente envolvida na sensibilidade gustativa e sabendo-se que os níveis circulantes desta hormona são diferentes entre obesos e normoponderais, este capítulo apresentou como objetivo estudar a relação entre os níveis desta hormona na saliva e a sensibilidade gustativa em crianças e em adultos com diferente IMC.

Capítulo 3

Descrição geral da metodologia

O trabalho realizado no presente estudo diz respeito a dois estudos principais, realizados: (1) com jovens adultos (18-20 anos) (2) com crianças de 8-9 anos. Toda a metodologia realizada nestes dois estudos se encontra descrita de uma forma detalhada dos capítulos 4 a 9.

O estudo realizado com jovens adultos (N=182), entre os 18 e 30 anos de idade, de uma forma geral consistiu na realização de testes sensoriais para avaliação do nível de resposta aos gostos amargo e doce. No caso do gosto amargo o composto testado foi o 6-n-propil-tiouracil (PROP), por este ser o mais geralmente utilizado na bibliografia em estudos acerca de diferenças inter-individuais na percepção gustativa. No que diz respeito ao gosto doce, e uma vez que não existe um teste validado que possa ser diretamente relacionado com o teste de resposta ao PROP, optou-se pela avaliação dos limiares de deteção da sacarose, dando os mesmos indicação da sensibilidade gustativa. Para além dos testes sensoriais, foram ainda feitas recolhas de saliva total, de forma não estimulada. Quer o protocolo de recolha de saliva, como o das análises laboratoriais das mesmas e análise de resultados aparecem detalhados nos capítulos 4 e 5.

À semelhança do ensaio realizado com os adultos, com o objetivo de relacionar a composição da saliva com a sensibilidade para os gostos amargo e doce, foi realizado um estudo, no qual participaram 387 crianças com idades compreendidas entre os 8 e 9 anos. Neste estudo, que contou com a colaboração da Administração Regional de Saúde do Alentejo, para avaliação dos parâmetros antropométricos, foram feitos testes sensoriais, recolhas de saliva total não estimulada e preenchimento de questionários referentes a preferências por diferentes alimentos. No capítulo 6 é detalhado o procedimento relativo à realização dos testes sensoriais (avaliação de limiares de deteção), avaliação dos parâmetros antropométricos, bem como o conteúdo e preenchimento dos questionários. No capítulo 7 é detalhada a metodologia de recolha e análise laboratorial das amostras de saliva.

Nas amostras de saliva de crianças foram ainda determinados os níveis de cortisol, através do método Cortisol Enzyme Immunoassay (Salimetrics®), detalhado no capítulo 8. Por fim, determinaram-se os níveis de leptina na saliva de adultos e crianças através do método ELISA RayBio^R Human Leptin.

Capítulo 4

Relação entre a composição da saliva e a resposta ao gosto amargo em adultos

4.1. Introdução

Um dos principais fatores, que influencia as escolhas alimentares, é a percepção gustativa dos alimentos. Muitas das substâncias tóxicas e/ou venenosas têm gosto amargo, pelo que a capacidade dos animais e humanos conseguirem detetar concentrações muito baixas deste estímulo, em termos evolutivos, tem sido importante para prevenir a ingestão de substâncias alimentares prejudiciais e o envenenamento (Chandrashekar *et al.*, 2000).

Ainda que a rejeição inata do gosto amargo seja uma característica comum aos humanos, há uma grande variabilidade na forma como diferentes indivíduos percebem este gosto, nomeadamente nas concentrações mínimas de estímulo percebido, na aceitação e nas preferências. O caso mais estudado de variações inter-individuais na sensibilidade gustativa é a diferente capacidade que indivíduos diferentes têm para perceber o gosto amargo dos compostos 6-n-propiltiouracilo (PROP) e feniltiocarbamida (PTC). Esta variação tem também sido estudada num contexto de nutrição e escolhas alimentares (Tepper *et al.*, 2008). As variações genéticas responsáveis pelas diferentes respostas ao PROP têm sido alvo de vários estudos, sendo conhecidos polimorfismos que afetam o gene que codifica o recetor TAS2R38 do gosto amargo. Com efeito, os polimorfismos deste gene resultam na substituição de três aminoácidos (Pro49Ala, Ala262Val e Val296Ile), dando origem a dois haplótipos comuns: PAV (variação dominante) e AVI (variação recessiva). Indivíduos homocigóticos ou heterocigóticos para o haplótipo PAV percebem o amargo do PROP em baixas concentrações e são denominados “sensíveis” (*tasters*), enquanto indivíduos que são homocigóticos para o haplótipo AVI não percebem o PROP ou percebem apenas em concentrações elevadas, sendo classificados como “pouco sensíveis” (*nontasters*). Os indivíduos heterocigóticos têm níveis de percepção intermédios (*medium tasters*) (Wooding *et al.*, 2004). Para além do contributo genético, existem outros fatores que concorrem para as diferentes percepções do composto PROP, tais como a idade, índice de massa corporal, dimorfismo sexual, e fatores locais como a composição da saliva (Tepper *et al.*, 2014).

A saliva tem um papel importante na percepção oral, visto que é o fluido que banha as diferentes estruturas orais, incluindo as estruturas responsáveis pela percepção do gosto. Além disso, é este o meio onde as moléculas sápidas dos alimentos são envolvidas e conduzidas para os locais de receção do gosto, sendo que os constituintes salivares podem interagir, de alguma forma, com as moléculas dos alimentos e/ou com as estruturas orais, podendo influenciar a percepção dos alimentos (Salles *et al.*, 2010).

No que diz respeito a uma possível interação entre constituintes salivares e moléculas de alimentos, a maior parte dos estudos tem sido realizada no contexto da adstringência. Esta sensação oral tátil, desencadeada por diversos compostos, entre os quais polifenóis e particularmente taninos, está dependente da interação destes compostos com proteínas salivares, principalmente proteínas ricas em prolina (PRPs), resultando na formação de precipitados e diminuição das propriedades lubrificantes deste fluido (Lee *et al.*, 2012; Canon *et al.*, 2010).

A relação entre a percepção do gosto amargo e a composição proteica da saliva começou a ser investigada nos últimos anos, no entanto, usando estímulos amargos diferentes e metodologias diferentes para distinguir os indivíduos em termos de percepção/sensibilidade. Morzel e colaboradores (Dsamou *et al.*, 2012) avaliaram a existência de diferenças no perfil proteico bidimensional da saliva total de homens em função dos seus limiares de deteção para a cafeína, referindo diferenças nos níveis de expressão de algumas proteínas, incluindo cistatinas salivares. Compararam também a composição proteica da saliva entre crianças com preferências diferentes para o gosto amargo da cafeína, sugerindo que proteínas como a anidrase carbónica (CA-VI), proteína Induzida por Prolactina (PIP), zinco α -2 glicoproteína e cistatinas estariam envolvidas nos diferentes níveis de preferência observado em crianças diferentes (Morzel *et al.*, 2014). No caso particular do amargo do composto PROP, uma equipa de investigadores italianos, avaliou a relação entre o proteoma salivar de adultos e a intensidade de resposta para este composto (fenótipo PROP), através de HPLC-ESI-IT-MS (Cabras *et al.*, 2012). Curiosamente, algumas das proteínas salivares referidas como diferencialmente expressas entre indivíduos com fenótipos diferentes não são as mesmas que haviam sido apontadas como diferencialmente expressas entre indivíduos com diferentes sensibilidades para o amargo da cafeína (Dsamou *et al.*, 2012). Cabras *et al.* (2012) referiram diferenças nos níveis de proteínas ricas em prolina (PRPs) básicas entre *tasters* e *nontasters*, não tendo observado diferenças nos níveis de cistatinas salivares. Estes diferentes resultados podem dever-se a diferentes compostos amargos testados e/ou a diferentes abordagens metodológicas, as quais têm diferentes capacidades de discriminação de proteínas. Por outro lado, é possível que as diferentes populações em estudo (Francesa e Italiana) tenham características sensoriais diferentes, que possam condicionar os resultados. É sabido que diferentes hábitos alimentares podem influenciar, quer a sensibilidade gustativa (Lanfer *et al.*, 2013), quer a composição salivar (da Costa *et al.*, 2008).

A eletroforese bidimensional (2-DE) tornou-se muito útil no estudo de misturas complexas de proteínas, como a saliva, pois, além da elevada capacidade de separação de proteínas com massas moleculares relativamente elevadas (de 10000 a 300000Da),

esta técnica tem ainda a vantagem de mapeamento de modificações pós-traducionais, permitindo a sua quantificação separada. Muitas proteínas salivares apresentam diferentes isoformas, algumas com características funcionais diferentes, tornando essencial esta comparação de diferentes formas proteicas de modo individual (Hirtz *et al.*, 2005). Após a separação das proteínas em gel, a identificação das proteínas separadas pode ser efetuada com espectrometria de massa (Al-Tarawneh *et al.* 2011).

Tendo em conta a relevância que o fenótipo PROP tem, em termos de parâmetro utilizado em estudos nutricionais e epidemiológicos, e uma vez que a informação obtida através de técnicas “*in-gel*” (2-DE) permite a visualização e comparação, não só de diferentes proteínas, mas também de diferentes isoformas da mesma proteína, o objetivo do presente trabalho consiste na comparação dos perfis 2-DE da saliva de indivíduos com diferentes fenótipos PROP, com identificação das proteínas salivares potencialmente envolvidas na resposta ao amargo do PROP, em adultos jovens portugueses.

4.2. Materiais e métodos

4.2.1- Indivíduos em estudo

Cento e oitenta e dois indivíduos caucasianos da Universidade de Évora, com idades compreendidas entre 18-30 anos, aparentemente saudáveis, participaram voluntariamente nos testes de sensibilidade gustativa. Cada indivíduo foi informado sobre o procedimento aplicado e o objetivo do estudo, tendo assinado um consentimento para a realização do mesmo (Anexo I). Os voluntários responderam ainda a várias questões acerca do seu estado de saúde em geral e saúde oral em particular, bem como questões relativas ao consumo de café, drogas, álcool e tabaco (Anexo II). Apenas os indivíduos sem doenças orais ou nasais que possam interferir com a perceção do gosto participaram neste estudo. Foi pedido a todos os indivíduos que não comessem nem bebessem, exceto água, pelo menos 1h30 minutos antes do início do teste, sendo que todos os testes foram realizados no período da manhã, entre as 10h30 e as 12h. Os testes sensoriais foram realizados duas vezes por cada indivíduo, em dias separados, com um intervalo de, no mínimo, quinze dias entre os mesmos.

O Índice de Massa Corporal (IMC) foi também determinado através da medição do peso, em balança eletrónica digital (com possibilidade de obter valores aproximados aos 100g), e da altura.

Do total de indivíduos testados, apenas os que apresentaram respostas concordantes nos dois dias de teste, foram considerados para análise. Nestas condições, foi considerado um total de 159 indivíduos, dos quais 90 mulheres e 69 homens.

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética da Universidade de Évora.

4.2.2- Estímulo gustativo, testes sensoriais e recolha de saliva

As soluções de PROP e NaCl foram preparadas no dia anterior ao teste, através da dissolução de cada um dos compostos em água destilada, armazenadas a 4°C e colocadas à temperatura ambiente umas horas antes da realização do teste. No início da sessão, todos os participantes lavaram a boca com água destilada. Seguidamente, foram instruídos para não engolirem, durante cinco minutos, e recolherem toda a saliva produzida na boca, por drenagem passiva, diretamente para um tubo de recolha colocado em gelo. As amostras foram posteriormente armazenadas a -20°C até análise laboratorial. Após esta primeira recolha de saliva, os participantes lavaram a boca com água destilada e iniciaram os testes sensoriais.

Para avaliar a capacidade de resposta ao gosto amargo, foi pedido aos indivíduos que registassem a intensidade percebida do gosto de três soluções de PROP (0,032; 0,32 e 3,2mmol/L) e três soluções de NaCl (0,01; 0,1 e 1,0mol/L) numa Escala de Magnitude rotulada (LMS) (anexo III), sendo o nível inferior representado por “Escassamente detetável” e o nível superior por “mais forte que o imaginável”. Os indivíduos podiam classificar as soluções em qualquer ponto da escala, de acordo com a metodologia descrita em Green *et al.* (1993).

Imediatamente após os testes com as soluções de PROP, procedeu-se à segunda recolha de saliva, durante cinco minutos, efetuada do modo descrito anteriormente. Após esta recolha de saliva, os participantes lavaram a boca com água destilada e iniciaram os testes com as soluções de NaCl, de modo semelhante ao descrito para os testes com PROP. Tanto as soluções de PROP como NaCl foram provadas por ordem crescente de concentração. Foi pedido aos participantes que lavassem a boca, com água destilada, no início e antes da prova de cada solução.

4.2.3- Determinação da taxa de fluxo salivar, pH e concentração proteica

A taxa de fluxo salivar, pH e concentração em proteína total foram determinados para os 159 indivíduos. Para determinação da taxa de secreção salivar, foi avaliado o

peso da saliva recolhida durante os cinco minutos, considerando a densidade deste fluido cerca de 1g/mL (Lamey & Nolan, 1994).

Pelo facto da viscosidade ser uma das características intrínsecas à saliva total humana, devido a presença, principalmente, de mucinas (maioritariamente glicoproteínas de elevada massa molecular), as amostras de saliva foram descongeladas em gelo e centrifugadas durante 30 minutos, 4°C, 13000g, para remoção das mesmas (Francis *et al.*, 2000; Schipper *et al.*, 2007). O sobrenadante resultante da centrifugação das duas recolhas de cada indivíduo foi misturado num *pool*, dividido em alíquotas e armazenado a -20°C.

O pH foi determinado usando um microeléctrodo medidor de pH calibrado (Hanna Instruments). O valor foi registado com aproximação a duas casas decimais.

A quantificação proteica, pelo método de *Bradford* (Hammond & Kruger, 1988), foi feita através da utilização do reagente previamente preparado [10% (m/v) reagente *Coomassie* G-250; 5% etanol 95%; 10% ácido fosfórico 85%]. Para traçar a curva de calibração, foram utilizadas concentrações de 25, 50, 75, 150 e 200µg/mL de albumina do soro bovino (BSA- **Bovine Serum Albumin**). As amostras de saliva foram descongeladas, em gelo, diluídas 2X, 4X, 8X e 16X, com água ultrapura. Foram aplicados 10µl de cada solução de BSA e o mesmo volume de cada amostra, em triplicado, em diferentes poços da microplaca. Posteriormente, adicionaram-se 200µL do reagente de Bradford. Após incubação à temperatura ambiente, durante 1-2 minutos, foram feitas as leituras de absorvância a um comprimento de onda de 590nm, num leitor de microplacas (Glomax, Promega). Para cada placa, traçou-se uma reta de calibração com os valores médios das absorvâncias de cada padrão de BSA em função da quantidade de proteína. Por interpolação, e tendo em conta o fator de diluição, calculou-se a concentração de proteína total para cada um dos triplicados das amostras.

4.2.4- Perfil proteico salivar

Foram avaliados perfis proteicos uni e bidimensionais, sendo considerados apenas os indivíduos que obtiveram classificação extrema de resposta ao PROP, ou seja, indivíduos *Supertasters* (ST) e *Nontasters* (NT).

4.2.4.1- Eletroforese SDS-PAGE

Amostras de saliva de 30 mulheres e 30 homens [15 indivíduos de cada grupo de sensibilidade (ST e NT), por sexo], recolhidas antes e depois dos testes sensoriais com PROP, foram sujeitas a SDS-PAGE (Laemmli, 1970).

Cada amostra de saliva foi testada em triplicado. Um total de 7,5µg de proteína de cada amostra de saliva foi aplicado em cada poço de um mini gel de 12% de poliacrilamida (Mini *Protean System*, Bio-Rad), usando o sistema de tampão *Laemmli* (Laemmli, 1970). A corrida eletroforética decorreu à voltagem constante de 150V até a frente de corrida atingir o final do gel. No final da corrida eletroforética, os géis foram fixados durante uma hora numa solução de 40% metanol e 10% ácido acético e corados durante duas horas com azul brilhante de *Coomassie* (*Coomassie Brilliant Blue*) (CBB) G-250. As imagens dos géis foram adquiridas através de digitalização com o *scanner* ImageScanner III (GE Healthcare) e o *software* Labscan. As imagens foram analisadas utilizando o *software* GelAnalyzer (GelAnalyzer 2010a by Istvan Lazar, www.gelalyzer.com). As massas moleculares foram determinadas de acordo com o padrão de massas moleculares que correu juntamente com as amostras (*Precision Plus Protein™ Dual Color Standards* 161-0394 Bio-Rad).

4.2.4.2- Eletroforese bidimensional (2-DE)

A avaliação da relação entre perfil proteico salivar e resposta ao gosto amargo do PROP foi feita em duas fases. Numa primeira fase, utilizou-se a saliva recolhida no período “antes” da estimulação com PROP, ou seja, antes da realização dos testes sensoriais descritos no ponto 2.2. Neste caso, dos 159 indivíduos em estudo, foram selecionadas aleatoriamente e analisadas amostras de 46 indivíduos, pertencentes a ambos os sexos e aos grupos extremos de resposta ao PROP (ST e NT). Foram considerados para análise géis de 23 amostras de mulheres (13 ST e 10 NT) e 23 de homens (12 ST e 11 NT). Cada amostra foi testada em duplicado.

Numa segunda fase, foram comparados perfis proteicos bidimensionais da saliva recolhida antes e depois do estímulo de modo a melhor avaliar essas diferenças. Trinta e duas amostras foram testadas utilizando eletroforese bidimensional (O'Farrell, 1975). Estas amostras correspondem a 16 indivíduos, 8 homens (4 NT e 4 ST) e 8 mulheres (4 NT e 4 ST), recolhidas no período “antes” e no período “depois” dos testes para avaliação da resposta ao PROP.

O procedimento experimental consistiu, numa primeira fase, em concentrar as amostras de saliva através da centrifugação em membranas com um *cut-off* de 3kDa (Nanosep®, Pall corporation). A concentração foi feita a 4°C e a uma rotação de 14000g pelo tempo necessário para ter uma quantidade de proteína total de 175µg num volume final inferior a 50µL. Após concentração, o volume de amostra obtido foi misturado com

tampão de solubilização [7M ureia, 2M tiourea, 4% (m/v) 1- propanosulfonato de 3-(3-colamidopropil) dimetilamónio (CHAPS), 2% (v/v) mistura de anfólitos (IPG *buffer*, GE healthcare), 40mM ditioneitol (DTT)], no volume necessário para, em conjunto com a amostra, perfazer um total de 250µL. Esta mistura foi incubada à temperatura ambiente durante 1h, sendo posteriormente centrifugada, durante 10 minutos a 10°C, a uma velocidade de 10000rpm. O sobrenadante de cada amostra foi recolhido e aplicado numa das ranhuras do suporte para tiras, do sistema Multiphor II (GE healthcare). Foram usadas tiras de gel comerciais, com gradiente de pH 3-11 NL de 13 cm (IPG strips, GE healthcare). As tiras foram colocadas em contacto com a amostra, ficando em reidratação passiva durante a noite, à temperatura ambiente e cobertas com óleo mineral (*Dry strip cover fluid*, GE healthcare).

Após reidratação, as tiras foram colocadas no sistema Multiphor II, para focagem isoeletrica das proteínas (primeira dimensão). A focagem ocorreu a uma temperatura constante de 18°C de acordo com o seguinte programa: passo 1 – subida para 150V (0:01h), passo 2 - 150V (1:00h), passo 3 – subida para 300V (modo gradiente) (0:30h), passo 4 – 300V (1:30h), passo 5 – subida para 3500V (modo gradiente) (4:00h), passo 6 – 3500V (6:00h).

Após focagem isoeletrica, as proteínas foram separadas, numa segunda dimensão, de acordo com as suas massas moleculares. Cada tira foi sujeita a dois passos de equilíbrio de 15 minutos cada. A solução de equilíbrio consistiu em 6M ureia, 75mM Tris-HCl pH 8.8, 29,3% (v/v) glicerol, 2% (m/v) SDS e 0,002% (m/v) de azul de bromofenol. Para o primeiro passo (de redução) foi adicionado, a esta solução, DTT, numa concentração final de 1% (m/v) e para o segundo passo (de alquilação) foi adicionada iodoacetamida, numa concentração final de 2,5% (m/v).

Após os dois passos de equilíbrio, cada tira foi lavada com tampão de corrida (com a mesma composição já descrita na secção referente à separação proteica por SDS PAGE) e colocada no topo de um gel de 12% de poliactilamida (16X16cm e 1mm de espessura). A tira foi imobilizada no gel de segunda dimensão pela adição de uma solução 0,5% (m/v) de agarose. Nalguns géis foi ainda aplicado um marcador de massas moleculares (Dual Color, BioRad, Ref 161-0324).

A corrida eletroforética decorreu numa tina vertical (Protean XL, Bio-Rad), a uma temperatura constante de 18°C e a uma voltagem inicial de 50V (durante 30 minutos), seguida de voltagem constante a 150V até a frente de corrida atingir o fim do gel. Seguidamente os géis foram colocados numa solução de fixação (10% ácido acético,

40% metanol) durante 2 horas, sendo de seguida corados com uma solução de azul brilhante *Coomassie* G-250 e descorados em várias mudanças de água destilada.

Os géis foram digitalizados utilizando o scanner ImageScanner III (GE Healthcare) e o *software* Labscan e a análise dos géis bidimensionais feita através da utilização do *software* ImageMaster Platinum v.7 (GE Healthcare). Para a análise de géis, foi feita a deteção automática de *spots*, tendo a mesma sido corrigida, com a edição manual dos *spots* que não foram corretamente assinalados, a adição de *spots* não assinalados e a eliminação de artefactos assinalados como *spots*. Posteriormente fez-se a correspondência (*match*) de *spots* entre os diferentes géis em comparação.

O cálculo das massas moleculares aparentes foi feito através do conhecimento das massas moleculares das proteínas presentes no padrão utilizado. Foi traçada uma curva entre o logaritmo da massa molecular e a mobilidade eletroforética relativa (*R_f*) das proteínas presentes no padrão. As massas moleculares das proteínas de interesse foram calculadas por interpolação gráfica.

O cálculo dos pontos isoeletricos aparentes foi feito por interpolação gráfica a partir de uma curva *standard* para tiras de 3-11 NL (Anexo IV).

No caso da comparação entre amostras de “antes” e “depois” do estímulo, usaram-se tiras de focagem isoeletrica de 7cm [(gradiente de pH 3-11 NL de 7cm (IPG *strips*, GE healthcare)] e géis de segunda dimensão de 7x10cm. O protocolo para a realização de eletroforese bidimensional em tiras de 7cm foi semelhante ao descrito anteriormente para as tiras de 13cm, com exceção da quantidade de proteína total de cada amostra (100µg) e do programa da focagem isoeletrica [(passo 1 – subida para 100V (0:01h), passo 2 - 300V (1:00h), passo 3 – subida para 3500V (4:00h), passo 4 – 3500V (3:00h)].

4.2.5- Identificação de proteínas por MALDI FTICR MS

4.2.5.1- Digestão trípica

A digestão trípica foi realizada com base no protocolo definido em Shevchenko *et al.* (2006).

As bandas foram excisadas manualmente dos géis, lavadas três vezes com acetonitrilo 50% (ACN) (15 minutos cada lavagem) e uma vez com ACN 100% (durante 15 minutos). As bandas de gel seco foram posteriormente incubadas 45 minutos com 10mM DTT a uma temperatura de 56°C, seguida de incubação, durante 30 minutos, no

escuro e à temperatura ambiente, com iodoacetoamida. Após a lavagem com ACN 50% (15 minutos) e ACN 100% (30 minutos), as bandas dos géis foram secas numa centrífuga com vácuo (*speed/Vac*). 15µL de de tripsina porcina (6,7ng/µL) (Sequencing Grade Modified Trypsin Promega) e 50mM de hidrogenocarbonato de amónio foram adicionados às bandas e incubados durante 45 minutos a 4°C. O excesso de liquido foi removido e 50µL de hidrogenocarbonato de amónio 50mM foi adicionado às bandas, procedendo-se à incubação a 37°C durante a noite. Os digeridos foram posteriormente recolhidos para novos tubos e armazenados a -20°C.

4.2.5.2- Espectrometria de Massa

A identificação de proteínas foi realizada por MALDI-FTICR-MS (Bruker Apex Ultra, Apollo II combi-source; Bruker Daltonics, Bremen, Germany), com um magnete de 7 tesla (Magnex corporation, Oxford UK). As amostras foram diluídas e concentradas usando uma coluna de fase reversa [Poros R2 (Applied Biosystems)] e eluídas juntamente com a matriz diretamente para a placa MALDI [target AnchorChip (BrukerDaltonics, Bremen, Germany)], de acordo com as instruções do fabricante. A matriz utilizada foi α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA; Fluka), a qual foi preparada a uma concentração de 10µg/µL em 50% ACN com 0,1% TFA (ácido Trifluoroacético). A massa dos péptidos monoisotópicos foi determinada usando o algoritmo SNAP 2 na versão 3.4 do *software* de análise (BrukerDaltonics). A calibração externa foi executada usando o espectro da digestão triptica de BSA, processado e analisado com o equipamento *Biotoools* 3.1 (BrukerDaltonics, Bremen, Germany).

4.2.5.3- Pesquisa na base de dados

A massa de péptidos monoisotópicos foi usada para pesquisar a identificação proteica através da utilização do *software Mascot* (Matrix Science, UK; Perkins et al. 1999). A base de dados *Swiss-Prot* “non redundant protein sequence” (assessed in june 2014), com restrição para *Homo Sapiens* foi utilizada para todas as pesquisas. Uma precisão de massa de 10ppm ou 25ppm, uma clivagem “em falta”, carbamidometilação de cisteína (modificação fixa) e oxidação de metionina (modificação variável) e modificações de aminoácidos variáveis, respetivamente, foram parâmetros considerados no *input* do *software*. Os critérios utilizados para aceitar a identificação foram a obtenção de uma pontuação de homologia significativa no *Mascot*.

4.2.6. Previsão de modificações pós-traducionais

Potenciais modificações pós-traducionais (PTMs), como fosforilação e glicosilação, foram avaliadas através de diferentes motores de busca: 1) *FindMod* (<http://www.expasy.ch/tools/findmod/>) e *GlycoMod* (<http://www.expasy.org/cgi-bin/glycomod>), examinam o mapa de péptidos resultante da proteína identificada. A identificação das PTMs resultou da observação das diferenças de massa entre as massas peptídicas determinadas experimentalmente e as massas peptídicas teóricas calculadas para a sequência da proteína específica; 2) *NetPhos 2.0* (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>) foi utilizado para prever fosforilações em resíduos de serina, treonina e tirosina.; 3) As glicosilações e fosforilações apresentadas na base de dados *swissprot* foram também consideradas. Apenas foram consideradas as PTMs previsíveis associadas a péptidos cujas massas observadas no espectro não corresponderam a péptidos da digestão teórica da proteína, ou seja, que não foram “*matched*” com a proteína identificada.

4.2.7. Western Blot

A imunodeteção por *Western Blot* (baseado na técnica de Towbin *et al.*, 1979) foi utilizada para comparação do nível de expressão das proteínas salivares CA-VI e cistatinas. Amostras de saliva de 30 mulheres e 30 homens (15 indivíduos de cada grupo de resposta ao PROP para cada sexo), recolhidas em ambos os períodos de recolha (antes de qualquer estimulação e após a estimulação com PROP) foram analisadas em triplicado. Após a separação por SDS-PAGE em géis de 14% poli(acrilamida), de 5µg de proteína de cada amostra (de modo semelhante ao descrito anteriormente, e com uma separação a 100V voltagem constante), as proteínas foram transferidas para uma membrana de PVDF (fluoreto de polivilideno) por *eletroblotting*, utilizando tampão de transferência [Tris-HCl 25mM, pH 8.3; glicina 192mM; metanol 20%; SDS 0,037% (m/v)]. Antes de iniciar a transferência das proteínas do gel para a membrana, a mesma foi ativada 5 segundos numa solução de metanol seguidos de 5 minutos em água destilada e 10 minutos em tampão de corrida.

Seguidamente, embebeu-se a membrana, folhas de papel de filtro com as dimensões do gel e o gel em tampão de transferência. Na superfície da cassette do sistema de transferência, correspondente ao cátodo colocou-se uma placa de fibra humedecida, seguindo-se por esta ordem: papel de filtro humedecido, gel, membrana de PDVF, segundo papel de filtro e placa de fibra. Todos estes componentes foram

colocados de modo a evitar a formação de bolhas de ar que pudessem diminuir o contacto entre o gel e a membrana.

Colocou-se a unidade de arrefecimento e encheu-se completamente o reservatório com tampão de transferência. A transferência ocorreu a uma corrente constante de 350mA durante 1 hora. Após a transferência a membrana foi mergulhada numa solução corante *Ponceau S* [20% (m/v) reagente *Ponceau*; 3% ácido acético], durante 10 minutos, com agitação suave, seguida de lavagens em várias passagens com água destilada à temperatura ambiente. Esta coloração teve como objetivo visualizar as bandas proteicas, confirmar o sucesso da transferência e avaliar (de forma grosseira) possíveis diferenças na quantidade de proteína corrida. No caso de uma amostra como a saliva este passo é importante, dada a impossibilidade de utilizar um marcador interno para aferir possíveis variações na quantidade de proteína total.

O bloqueio foi feito em 5% (m/v) de leite em pó em TBS-T, durante 2h à temperatura ambiente com agitação. A membrana foi cortada, sendo a parte superior incubada com o anticorpo primário anti-CA-VI (sc-99173; Santa Cruz *Biotechnology*; diluição: 1:200), durante a noite, a 4°C e a parte inferior com o anticorpo primário anti-cistatinas S-SA-SN (sc-73884, Santa Cruz *Biotechnology*; diluição: 1:200), durante a noite a 4°C. Após a incubação com o anticorpo primário, efetuaram-se três lavagens, de 15 minutos cada, com uma solução de lavagem [0,5% (m/v) de leite em pó em TBS-T], com agitação suave. As bandas de CA-VI e cistatina foram detetadas com um anticorpo secundário ligado a fosfatase alcalina [anti-coelho (S373B, Promega) e anti-ratinho (S372B, Promega), respetivamente, com uma diluição 1:10000], usando um substrato quimiofluorescente (ECF Plus *Western Blotting Detection Reagents*, GE, Healthcare). As membranas foram reveladas num transiluminador (Bio-Rad Gel-doc system) e a análise semi-quantitativa da expressão das bandas foi realizada através do software Bio-Rad Image Lab 5.2.1.

4.2.8. Tratamento estatístico dos resultados

Todos os dados foram analisados usando estatística descritiva e inferencial. A normalidade e homocedasticidade foram avaliadas através dos testes de Kolmogorov-Sminorff e Levene, respetivamente. A comparação entre sexos e IMC em termos perceção gustativa foi feita através do teste do qui-quadrado. *One-way ANOVA* foi utilizada para comparar médias de parâmetros salivares (concentração proteica total, taxa de fluxo salivar e pH salivar) entre grupos com diferente resposta ao PROP. As médias foram comparadas através do teste de Tukey. Quando os dados não apresentaram normalidade nem homocedasticidade, a análise foi feita recorrendo a

testes não paramétricos (Kruskal-Wallis). Para comparação dos parâmetros salivares (expressão individual de bandas proteicas de perfis SDS PAGE e das membranas *Western Blot*) foi realizado o teste T-Student e Mann-Whitney (no caso dos dados não apresentarem distribuição normal).

Relativamente aos perfis bidimensionais, as percentagens de volume dos *spots* proteicos foram testadas usando ANOVA- GLM (*General Linear Model*) com 2 fatores fixos (grupo de percepção gustativa e sexo). O coeficiente de correlação de Spearman foi utilizado para verificar a relação entre a intensidade percebida de PROP (diferença entre as os valores das intensidades de PROP e NaCl) e a percentagem de volume dos *spots*, e a relação entre o IMC e a percentagem de volume dos *spots*.

Toda a análise estatística foi realizada com recurso ao *software* SPSS versão 21.0 (SPSS Inc., Chicago, USA). As diferenças foram consideradas para um intervalo de confiança de 95%.

4.3. Resultados

4.3.1 Percepção gustativa dos indivíduos e IMC

A classificação dos indivíduos de acordo com a capacidade de resposta para o gosto amargo (PROP) efetuou-se tendo em conta a diferença das intensidades percebidas de PROP e NaCl, segundo *Tepper et al.* (2001). Os indivíduos foram classificados em *supertasters* (ST), *médium tasters* (MT) e *nontasters* (NT), se cada solução de PROP foi percebida com maior, igual ou menor intensidade, respetivamente, que a solução de NaCl (figura 4.1).

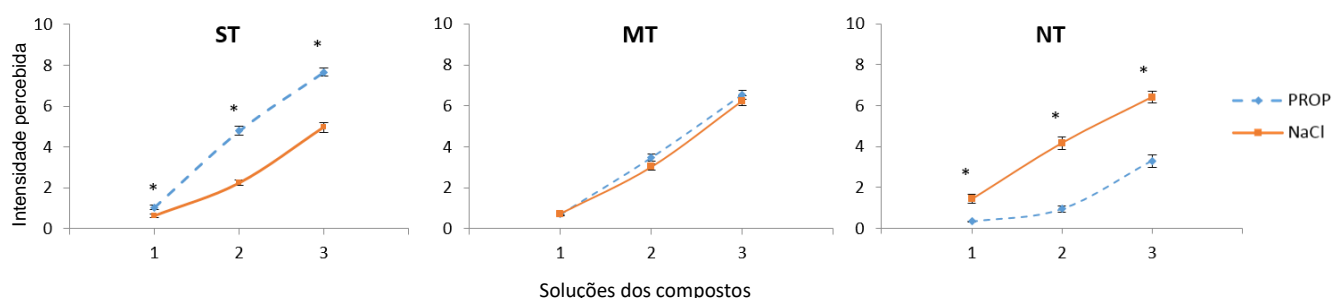


Figura 4.1 – Classificação dos indivíduos consoante a resposta ao amargo (PROP). Os números 1, 2 e 3 referem-se às três soluções de PROP e NaCl. Valores são media \pm EPM (* diferenças são estatisticamente significativas para $P < 0,05$).

Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre homens e mulheres na proporção de indivíduos pertencentes a cada grupo de resposta ao PROP (31,9% ST, 40,6% MT e 27,5% NT em homens; 28,9% ST, 50% MT e 21,5% NT em mulheres).

Vinte e três por cento dos indivíduos analisados neste estudo, apresentaram excesso de peso (IMC>25). Destes, uma maior percentagem de indivíduos são MT e uma menor percentagem são NT, comparativamente a indivíduos normoponderais. A distribuição dos indivíduos em estudo tendo em conta a capacidade de resposta ao PROP e o IMC, encontra-se representada na tabela 4.1.

Tabela 4.1 – Percentagem de indivíduos normoponderais e obesos pertencentes a cada grupo de capacidade de resposta para o gosto amargo.

			% indivíduos		P (teste X ²)
			IMC « 25	IMC > 25	
Grupos de capacidade de resposta para o amargo	Total	ST	30	37	0,043
		MT*	41,3	51,6	
		NT*	28,7	11,4	
	Homens	ST	36,4	22,7	0,067
		MT	29,5	59,1	
		NT	34,1	18,2	
	Mulheres	ST	31,1	33,3	0,136
		MT	4,6	66,7	
		NT	24,3	0[#]	

*Diferenças entre indivíduos normoponderais e com excesso de peso na distribuição pelos grupos de resposta ao PROP, obtidas através do teste do Qui-quadrado. Diferenças para P<0,05.
- estes resultados baseiam-se numa amostra constituída por um N de mulheres com excesso de peso muito inferior ao de mulheres normoponderais (N= 12 e N=100, respetivamente)

4.3.2- Composição proteica da saliva

4.3.2.1- Taxa de fluxo salivar, pH e concentração proteica total

Indivíduos pertencentes a diferentes grupos de capacidade de resposta ao amargo não apresentaram diferenças significativas na concentração proteica total em ambos os períodos de recolha (ante e depois da estimulação com o composto PROP). Este resultado observou-se tendo em conta o total de indivíduos e tendo em conta o

sexo. No entanto, comparando os dois períodos de estimulação observaram-se diferenças significativas nos indivíduos ST e NT. Com efeito, indivíduos ST apresentaram uma diminuição significativa da concentração após a estimulação com o composto amargo (tabela 4.2). Esta diminuição observou-se tanto em homens (antes: 489,25±36,34 vs. depois: 388,71±18,59; p=0,003) como em mulheres (antes: 472,62±38,02 vs. depois: 328,38±25,36; p=0,0005). Considerando os indivíduos NT, observou-se igualmente uma diminuição significativa da concentração após a estimulação com o composto amargo (tabela 4.2). Esta diminuição foi observada tanto em homens (antes: 507,18±3,57 vs. depois: 317,22±30,38; p=0,0005) como em mulheres (antes: 399,57±29,11 vs. depois: 298,88±19,44; p=0,0001).

Tabela 4.2 – Comparação de parâmetros salivares (média ± erro padrão) nos dois períodos de recolha para cada grupo de resposta para o gosto amargo. Estes valores referem-se ao total de indivíduos em estudo.

Número total de indivíduos (média ± erro padrão)										
Grupos de resposta ao PROP		Concentração proteica (µg/mL)			Taxa de secreção salivar (mL/min)			pH		
		Antes	Depois	p	Antes	Depois	p	Antes	Depois	p
		ST	480,07±26,30*	355,19±16,89*	0,0005	0,47±0,04*	0,53±0,04*	0,011	7,50±0,15*	8,22±0,13*
MT	427,49±2,03	386,54±15,45	0,101	0,49±0,03*	0,57±0,04*	0,002	7,66±0,12	7,50±0,22	0,503	
NT	456,96±26,65*	308,66±18,35*	0,0005	0,55±0,04	0,58±0,05	0,436	7,68±0,09	7,46±0,2	0,250	

*Diferenças significativas entre períodos de recolha para cada grupo de resposta ao PROP, obtidas através do teste T. Diferenças significativas para P<0,05

Relativamente à taxa de secreção salivar (mL/min), embora não existam diferenças em cada período de recolha (antes e depois da estimulação com o composto PROP), indivíduos ST e MT diferiram em termos de taxa de secreção com a estimulação: para indivíduos ST observou-se um aumento da taxa de secreção salivar de 0,47±0,04 para 0,53±0,04 (P=0,011), após estimulação com PROP. No caso de indivíduos MT, observou-se um aumento da taxa de secreção salivar de 0,49±0,03 para 0,57±0,04 (P=0,002), após estimulação com PROP (tabela 4.2). Tendo em conta o sexo, não foram observadas diferenças significativas na taxa de secreção entre períodos de estimulação.

Relativamente ao pH da saliva, embora não existam diferenças em cada período de recolha (antes e depois da estimulação com o composto PROP), indivíduos ST e NT diferiram em termos de alterações do pH salivar com a estimulação: para indivíduos ST observou-se um aumento do pH salivar de $7,50 \pm 0,15$ para $8,22 \pm 0,13$ ($P=0,0005$), após estimulação com PROP. Tendo em conta indivíduos NT, as diferenças foram significativas apenas em mulheres, nas quais o pH salivar diminuiu após a estimulação com PROP ($7,45 \pm 0,13$ vs. $6,33 \pm 0,18$ antes e depois do estímulo com o composto PROP, respetivamente; $P=0,0005$) (tabela 4.2).

4.3.2.2- Perfil proteico unidimensional (SDS-PAGE)

Comparando o perfil proteico salivar, por SDS-PAGE, observaram-se diferenças significativas entre homens e mulheres. As bandas identificadas, por espetrometria de massa (tabela 4.3), como albumina (banda D) e zinco- α -2 glicoproteína (banda G) apresentaram expressão mais elevada em mulheres, comparativamente a homens ($11,27 \pm 0,51$ vs. $9,16 \pm 0,70$, para a banda D e $8,89 \pm 0,33$ vs. $7,83 \pm 0,38$ para a banda G, em mulheres e homens, respetivamente). A banda J, identificada como cistatina-SN, por outro lado, apresentou uma expressão diminuída nas mulheres, comparativamente a homens ($11,98 \pm 0,82$ vs. $14,99 \pm 1,07$ em mulheres e homens, respetivamente). Os perfis proteicos encontram-se representadas na figura 4.2.

Observaram-se diferenças significativas, entre grupos extremos de resposta ao PROP, no nível de expressão de duas bandas proteicas. A banda H com massa molecular aparente de 24,3kDa (Figura 4.2), identificada, por espetrometria de massa, como uma mistura das proteínas região C da imunoglobulina K e homólogo B da proteína grânulo de zimogénio, apresentou diferenças significativas entre ST e NT, apenas em mulheres, com uma expressão mais elevada no grupo NT, comparativamente ao grupo ST. Estas diferenças na expressão da banda H entre mulheres com diferente resposta ao PROP observaram-se quer na saliva recolhida antes (ST: $8,29 \pm 0,29$ VS NT: $10,76 \pm 0,44$; $P= 0,0005$), quer na recolhida depois do estímulo (ST: $6,87 \pm 0,41$ VS NT: $9,12 \pm 0,15$; $P= 0,0005$) (figura 4.3A). A banda identificada como Proteína induzida por prolactina (PIP) apresentou diferenças significativas entre grupos de resposta ao PROP, tendo uma expressão mais elevada em indivíduos NT, comparativamente a ST (figura 4.3B). De realçar que estas diferenças entre grupos de resposta ao PROP se observaram quer na saliva recolhida antes (ST: $3,54 \pm 0,15$ VS NT: $4,88 \pm 0,58$; $P= 0,025$) quer na recolhida depois do estímulo (ST:

3,84±0,17 VS NT: 4,89±0,42; P= 0,042). As bandas encontram-se representadas na figura 2. Os detalhes relativos à identificação proteica encontram-se na tabela 4.3.

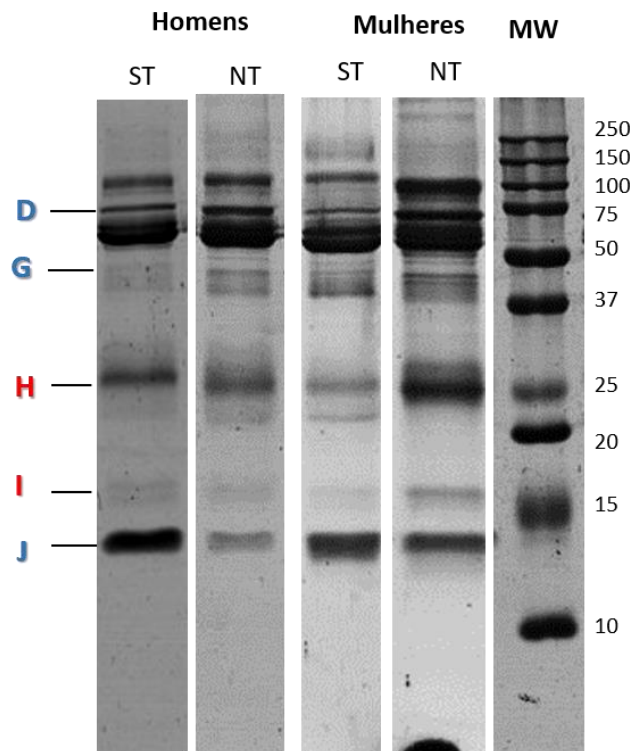


Figura 4.2- Imagem representativa de perfis proteicos obtidos por separação eletroforética unidimensional (SDS-PAGE). Estão assinaladas as bandas para as quais se observam diferenças significativas entre grupos de resposta ao PROP (bandas a vermelho) e entre sexos (bandas a azul). NT- *nontasters*; ST- *supertasters*; MW- marcador de massas moleculares (kDa).⁹

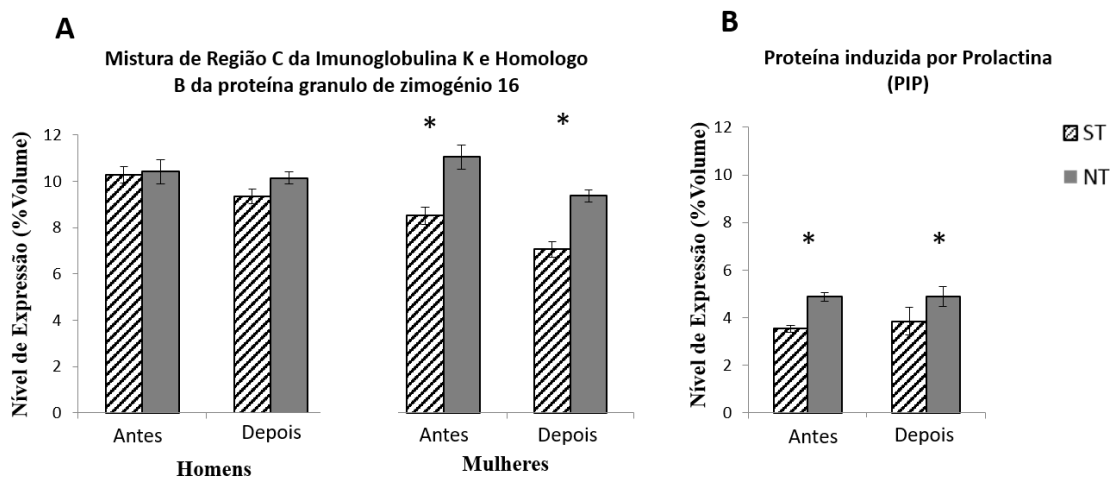


Figura 4.3 – Níveis de expressão das bandas proteicas (A: banda H; B: banda I) que apresentaram diferenças significativas entre indivíduos com diferente resposta para o PROP, na saliva recolhida antes e depois do estímulo. (Média ± Erro padrão; *diferenças são estatisticamente significativas para P<0,05).

Tabela 4.3 – Identificação, por espectrometria de massa, das proteínas salivares diferencialmente expressas entre sexos (letra da banda a azul) e entre grupos de resposta ao PROP (letra da banda a vermelho)

Banda	Proteína	Referência de entrada <i>uniprot</i>	MW (kDa) estimada/teórica	Score de identificação	Cobertura de sequência (%)	Nº peptidos matches
D	Albumina	Q86YG0	71,5/71,3	150	26	15
G	Zinco- α -2 glicoproteína	P25311	42,8/34,5	78	21	6
H	Região C da cadeia K de imunoglobulina	P01834	26,6/11,7	57	50	4
	Homologo B da proteína 16 de grânulo de zimogénio	Q96DA0	26,6 22,7	75	37	6
I	Proteína induzida por prolactina	P12273	15,9/16,8	105	55	8
J	Cistatina-SN	P01037	14,4/16,6	99	60	7

4.3.3- Expressão de CA-VI e Cistatina tipo S, SA, SN por *Western Blot*

Uma banda, com massa molecular aparente de 42kDa, foi marcada por *western Blot* com o anticorpo primário anti-CA-VI. Comparando a expressão desta banda entre grupos de resposta para o PROP, tendo em conta os dois períodos de recolha (antes e depois do estímulo), constataram-se diferenças significativas em homens, na saliva recolhida antes da estimulação com PROP, sendo que homens ST apresentaram uma expressão mais elevada, comparativamente a NT (ST: $1,12 \times 10^6 \pm 1,64 \times 10^5$ VS. NT: $5,44 \times 10^5 \pm 5,94 \times 10^4$; $P=0,004$). Adicionalmente, investigou-se se os níveis desta proteína se alteram após o contacto com a solução de PROP e se o comportamento foi semelhante em todos os grupos de sensibilidade. Com efeito, em ambos os sexos, indivíduos ST apresentaram uma diminuição significativa na expressão de CA-VI após a estimulação com PROP [homens ST- antes: $1,125 \times 10^6 \pm 1,64 \times 10^5$ vs. depois: $5,29 \times 10^5 \pm 1,63 \times 10^5$ ($p=0,007$); mulheres ST- antes: $4,43 \times 10^5 \pm 9,42 \times 10^4$ vs. depois: $1,39 \times 10^5 \pm 2,34 \times 10^4$; ($p=0,018$)], enquanto que nos indivíduos NT essa alteração não foi observada (figura 4.4).

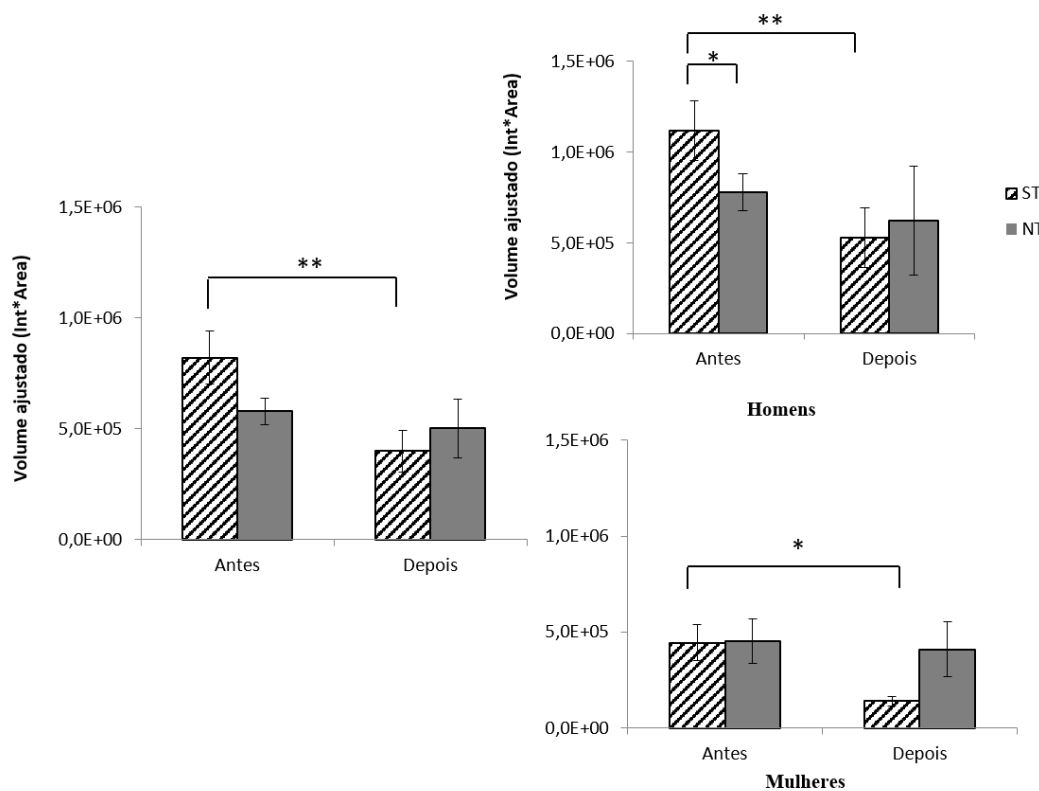


Figura 4.4 – Níveis de expressão de CA-VI (média \pm EPM) nas amostras de saliva mista recolhidas antes e depois da estimulação com PROP. [densidade ótica obtida usando uma análise densitométrica. Estes valores compreendem a correção para o background, a qual foi aplicada para cada banda através da normalização de uma região adjacente da membrana. Diferenças estatisticamente significativas para: * $P < 0.05$ ou ** $P < 0.01$].

Ajustando os valores de expressão da proteína CA-VI por unidade de volume (tendo em conta a concentração proteica), constataram-se diferenças significativas, no período de recolha “antes” do estímulo, entre grupos de capacidade de resposta em ambos os sexos. Com efeito, as mulheres NT apresentaram uma expressão mais elevada comparativamente a ST, enquanto que nos homens, foram os indivíduos ST que apresentaram um aumento significativo de expressão.

As proteínas cistatinas tipo S, SA, SN foram detetadas como uma única banda com aproximadamente 13,6kDa, o que está em conformidade com a massa molecular teórica das cistatinas S, SA e SN. Níveis de expressão mais elevados desta proteína foram observados na saliva de indivíduos NT, em comparação com ST, mas apenas na saliva recolhida após a estimulação com PROP e estatisticamente significativos apenas em homens (ST: $2,57 \times 10^5 \pm 4,88 \times 10^4$ vs. NT: $1,89 \times 10^6 \pm 4,80 \times 10^5$; $P = 0,0005$). Os níveis

de expressão de cistatinas salivares também variaram do período “antes” para o período “depois” do estímulo: observou-se uma diminuição desses níveis em indivíduos ST [homens- antes: $5,79 \times 10^5 \pm 1,14 \times 10^5$ vs. depois: $2,57 \times 10^4 \pm 4,88 \times 10^4$ ($P=0,017$); mulheres- antes: $5,71 \times 10^5 \pm 1,16 \times 10^5$ vs. depois: $1,99 \times 10^5 \pm 4,83 \times 10^4$ ($P=0,003$)]. No caso dos homens, a resposta ao estímulo, por parte do grupo NT, é oposta, aumentando significativamente os níveis de expressão desta proteína (antes: $3,21 \times 10^5 \pm 7,59 \times 10^4$ vs. depois: $1,89 \times 10^6 \pm 4,80 \times 10^5$; $P=0,0005$). No caso das mulheres isso não se observou, (antes: $4,55 \times 10^5 \pm 9,87 \times 10^4$ vs. depois: $2,88 \times 10^5 \pm 7,04 \times 10^4$; $P=0,146$) (figura 4.5).

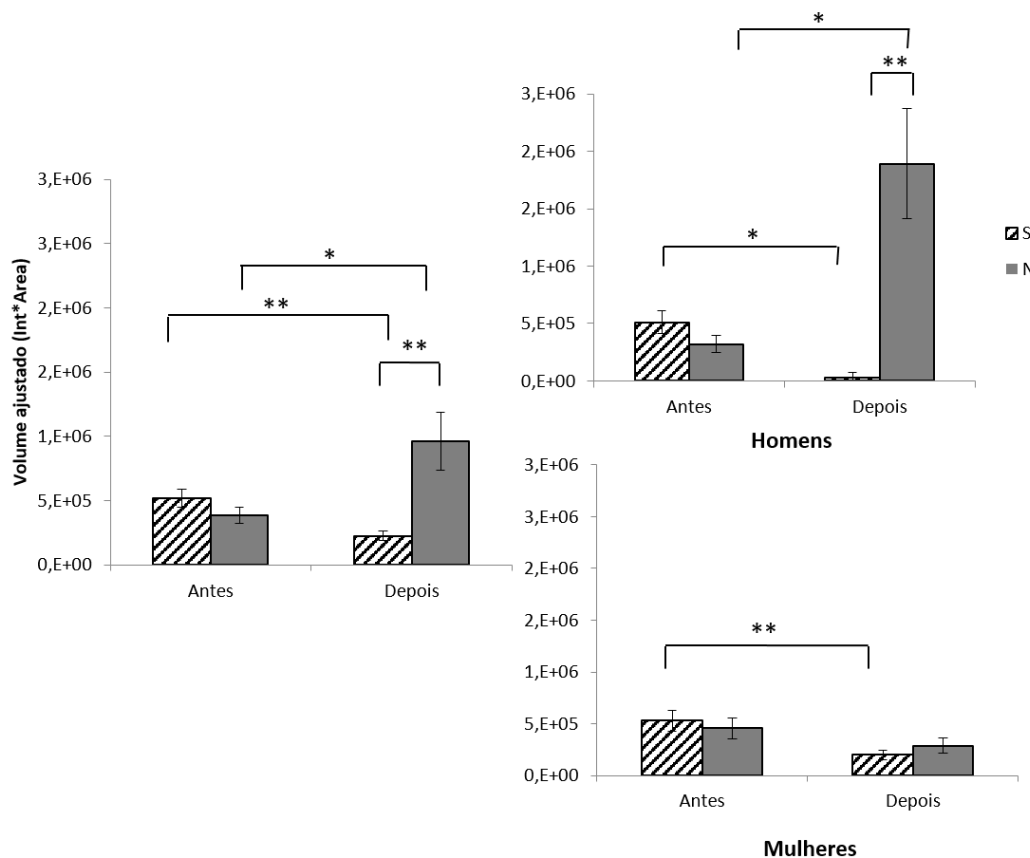


Figura 4.5 – Análise *Western Blot* para Cistatina presente nas amostras de saliva total, recolhidas antes e depois da estimulação com PROP, para diferentes grupos de capacidade de resposta para o amargo. Densidade ótica foi obtida usando uma análise densitométrica. Estes valores compreendem a correção para o *background*, a qual foi aplicada para cada banda através da normalização de uma região adjacente da membrana. Os dados correspondem a média \pm EPM (diferenças são estatisticamente significativas para: * $P < 0,05$ ou ** $P < 0,01$).

4.3.4- Perfil proteico bi-dimensional (2-DE) da saliva recolhida antes do estímulo

4.3.4.1. Comparação do perfil proteico de homens e mulheres

Comparando os perfis proteicos de homens e mulheres, independentemente da percepção gustativa, observaram-se 12 *spots* proteicos diferencialmente expressos entre os dois sexos (Tabela 4.4; figura 4.6). Estes *spots* correspondem às proteínas região C da cadeia K de imunoglobulinas (*spot* 10), recetor polimérico de imunoglobulinas (*spot* 69), CA-VI (*spot* 28), actina citoplásmica (*spots* 47 e 49) e isoformas de α -amilase (*spots* 58, 61, 72, 73, 74, 78, 79). Destas, apenas uma isoforma de actina citoplásmica 1 (*spot* 49) se encontrou aumentada nos homens, apresentando as restantes uma expressão significativamente mais elevadas em mulheres.

Tabela 4.4-Identificação e comparação das proteínas diferencialmente expressas entre homens e mulheres.

Spot	Proteína	Referência de entrada Uniprot	MW (kDa) Estimado/teórico	pI Estimado/teórico	Score ID	C. Seq. (%)	Nº Pep. Match	% Volume (média ± erro padrão)		P
								Homens	Mulheres	
10	Região C da cadeia K de imunoglobulinas	P01834	25,9/11,8	6,8/5,6	67	50	4	0,62±0,07	0,81±0,08	0,022
28	Anidrase carbónica VI	P23280	42,7/35,5	6,1/6,5	45	10	4	0,05±0,01	0,08±0,01	0,014
47	Actina citoplasmica 1	Q96HG5	40,2/42,1	5,0/5,3	164	33	12	0,10±0,01	0,17±0,02	0,002
49	Actina citoplasmica 1	Q96HG5	42,7/42,1	5,1/5,3	121	34	13	0,42±0,06	0,24±0,06	0,026
58	α-amilase 1	P04745	32,9/58,4	6,2/6,5	132	26	11	0,06±0,01	0,11±0,01	0,002
61	α-amilase 1	P04745	34,3/58,4	6,3/6,5	69	22	8	0,10±0,03	0,19±0,02	0,027
69	Recetor polimerico de imunoglobulina	P01833	91,4/84,4	6,8/5,6	108	17	11	0,47±0,07	0,70±0,07	0,023
72	α-amilase 1	P04745	55,3/58,4	5,9/6,5	115	60	24	5,57±0,60	7,82±0,64	0,014
73	α-amilase 1	P04745	57,3/58,4	6,0/6,5	138	35	16	1,15±0,22	1,80±0,23	0,047
74	α-amilase 1	P04745	59,4/58,4	6,8/6,5	161	29	15	3,86±0,50	5,60±0,53	0,022
78	α-amilase 1	P04745	55,3/58,4	6,6/6,5	115	33	14	1,33±0,16	2,00±0,17	0,006
79	α-amilase 1	P04745	61,5/58,4	6,6/6,5	111	47	22	1,31±0,20	2,44±0,21	0,0005

MW – massas moleculares (kDa); pI – ponto isoelétrico; C. Seq. – cobertura de sequência (%); Pep. – Peptidos; Score ID – score de identificação

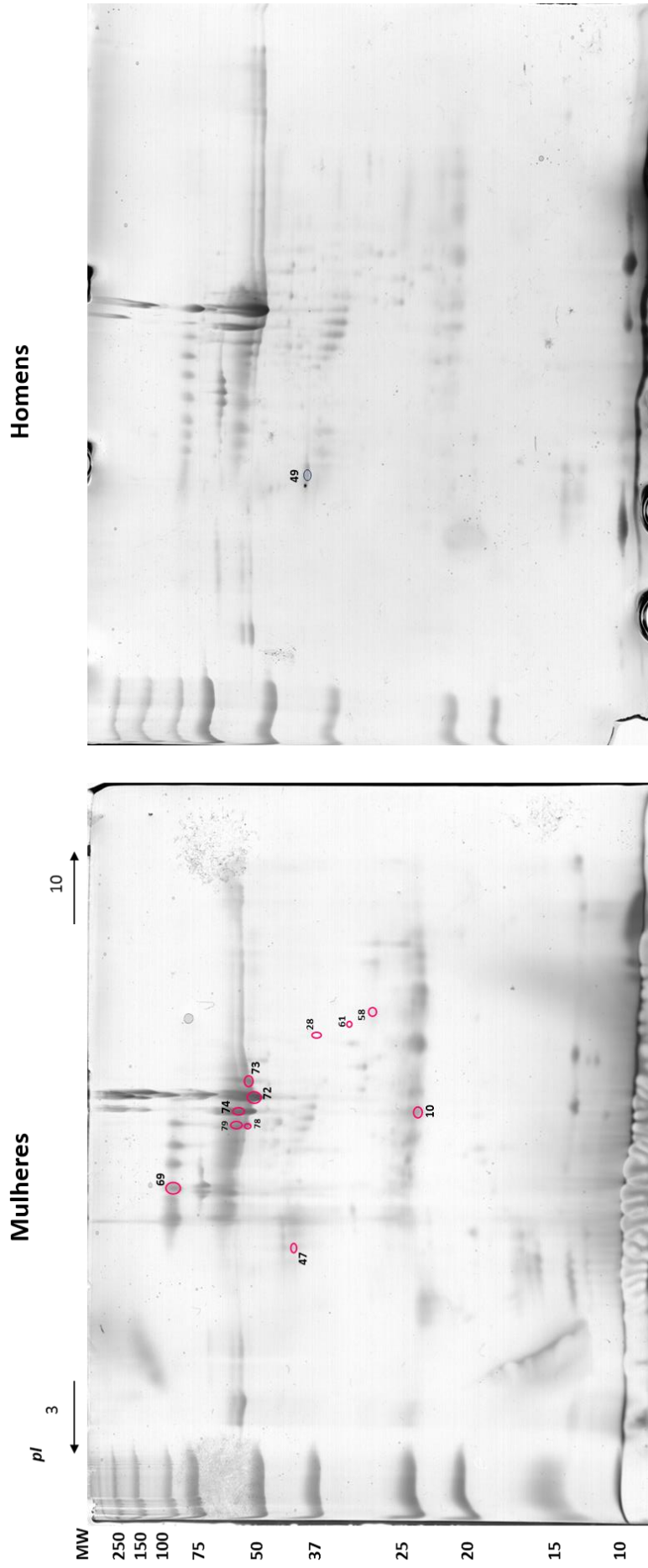


Figura 4.6 – Imagens representativas do perfil proteico salivar bidimensional de mulheres e homens. No primeiro perfil encontram-se representados os *spots* com expressão mais elevada em mulheres, comparativamente a homens; no segundo perfil encontra-se representado o *spot* com expressão mais elevada em homens, comparativamente a mulheres. MW – massas moleculares (kDa); pI – ponto isoeletrico.

4.3.4.2 Avaliação da correlação entre IMC e expressão proteica (% volume dos spots)

A análise de comparação da expressão proteica entre grupos de IMC, revelou três *spots* com expressão significativamente mais elevada em homens normoponderais, comparativamente a excesso de peso: *spots* 14 (não identificado), 26 (não identificado) e 56 (identificado como região C da cadeia K de imunoglobulina). Os *spots* 55 (não identificado) e 134 (não identificado), embora não tenham apresentado diferenças significativas, apresentaram tendência no mesmo sentido, ou seja, para aumento de expressão em homens normoponderais. Por outro lado, os *spots* 87 (identificado como albumina) e 88 (não identificado) apresentaram uma expressão significativamente maior em indivíduos com excesso de peso, comparativamente a normoponderais (tabela 4.5; figura 4.8). Esta comparação entre grupos de IMC é apresentada apenas para homens, visto que, em 100 mulheres, apenas 12 apresentam excesso de peso dificultando a comparação entre grupos. Assim, no caso das mulheres, apenas se consideraram relacionados com o IMC os *spots* para os quais se observaram correlações significativas entre expressão proteica e IMC.

No que diz respeito à relação entre IMC e expressão proteica, observaram-se correlações significativas em homens e mulheres, separadamente. Relativamente aos homens, sete *spots* apresentaram uma correlação significativa moderada positiva com o IMC, ou seja, homens com IMC mais elevado, apresentaram maior expressão proteica dos *spots*: 27 (identificado como região C da cadeia K de imunoglobulinas), 39 (identificado como imunoglobulina J), 69 (identificado como recetor polimérico de imunoglobulina), 80 (não identificado), 85 (identificado como região C da cadeia α -1 de imunoglobulinas), 86 (identificado como região C da cadeia α -2 de imunoglobulinas) e 87 (identificado como Albumina). Por outro lado, dois *spots* apresentaram uma correlação negativa com o IMC, ou seja, homens com IMC mais elevado apresentaram menor expressão proteica dos *spots*: 57, que apresentou uma correlação forte negativa (não identificado); 63, que apresentou uma correlação moderada negativa (identificado como CA-VI) (figura 4.7A; figura 4.8).

Em mulheres observou-se um *spot* que apresentou correlação significativa moderada positiva com o IMC: *spot* 71 (identificado como α -amilase). Por outro lado, observaram-se dois *spots* negativamente correlacionados com o IMC: *spot* 23 (identificado como região C da cadeia K de imunoglobulinas), que apresentou uma correlação moderada, e o *spot* 28 (identificado como CA-VI), que apresentou uma correlação forte (figura 4.7B; figura 4.8).

Curiosamente, a proteína região C da cadeia K de imunoglobulinas, identificada nos *spots* 27 e 23, apresenta uma correlação positiva e negativa com o IMC, em homens e mulheres, respetivamente. A proteína CA-VI, aqui identificada nos *spots* 28 e 63, apresentou uma correlação negativa com o IMC tanto em homens como em mulheres.

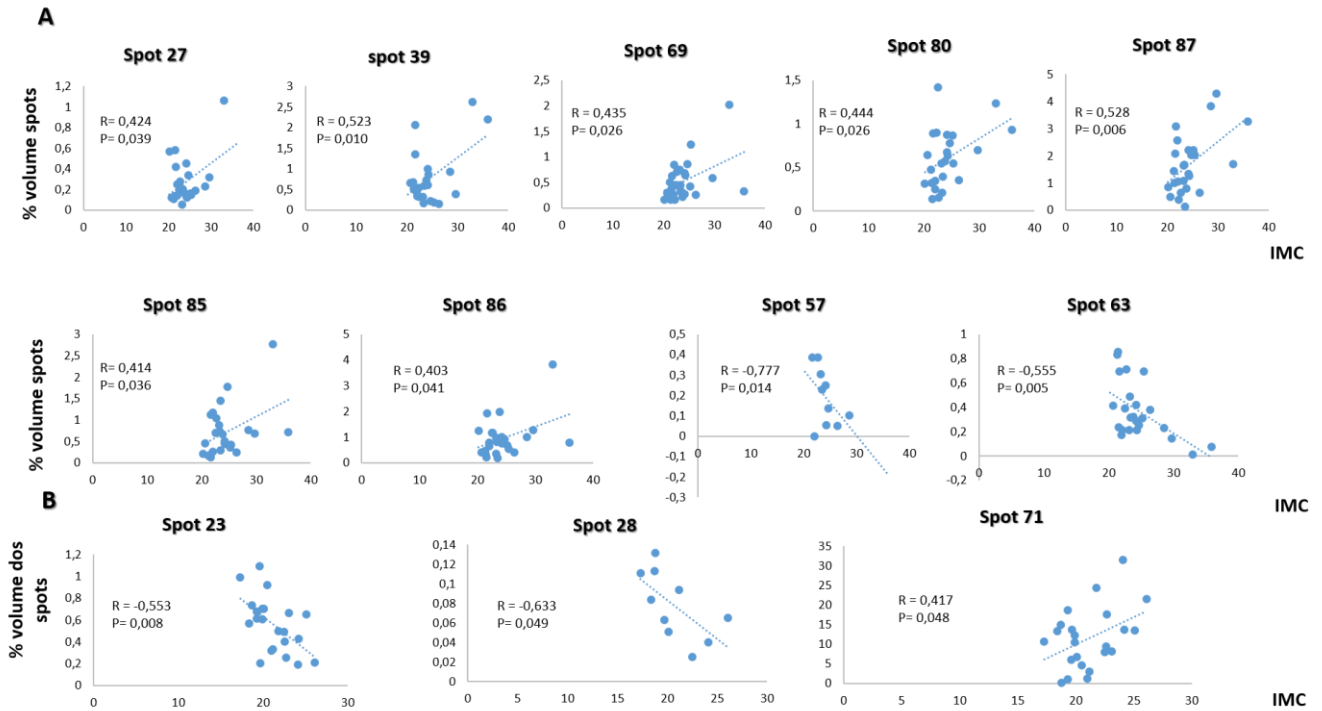


Figura 4.7- Gráficos da relação significativa entre a expressão proteica (% volume dos spots) e o IMC em homens (A) e mulheres (B). As diferenças são significativas para $P < 0,05$.

Tabela 4.5- Identificação por espectrometria de massa das proteínas diferencialmente expressas entre homens normoponderais e com excesso de peso

Spot	Proteína	Ref. de entrada <i>Uniprot</i>	MW (kDa) Estimado/ teórico	<i>pI</i> Estimado / teórico	Score ID	C. Seq. (%)	Nº pep <i>match</i>	% Volume (média ± erro padrão)		P
								NP	Excesso de peso	
14	n.i	-	30/-	6,6/-	-	-	-	0,26±0,04	0,11±0,02	0,002
26	n.i	-	25,9/-	5,5/-	-	-	-	0,23±0,05	0,08±0,02	0,011
56	Região C da cadeia K de imunoglobulinas	P01834	25,9/11,7	6,8/5,58	64	50	4	1,87±0,28	0,83±0,18	0,015
87	Albumina	Q86YG0	73,6/71,3	5,5/5,9	130	18	11	1,35±0,18	2,56±0,48	0,007
88	n.i	-	73,6/-	5,6/-	-	-	-	2,18±0,22	3,37±0,74	0,044

MW – massas moleculares (kDa); *pI* – ponto isoelétrico; C.Seq. – cobertura de sequência (%);
Pep. – Peptidos; NP-normoponderais; (-) valores em falta por insucesso na identificação

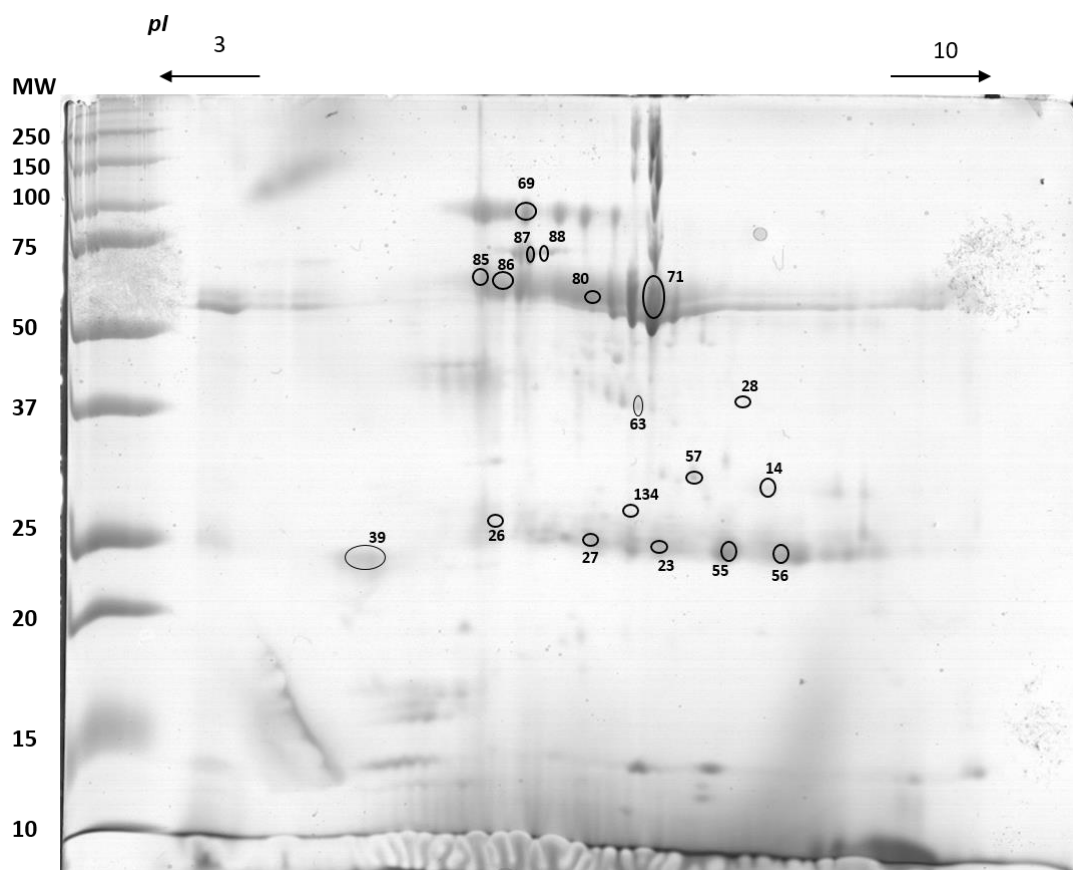


Figura 4.8- Imagem representativa do perfil proteico salivar bidimensional, com representação de *spots* diferencialmente expressos entre grupos de diferente IMC (*spots* 14, 26, 56, 55, 134, 87, 88) e dos *spots* que apresentaram correlação significativa com IMC em homens (*spots* 27, 69, 39, 85, 80, 86, 87, 54, 57, 63) e mulheres (*spots* 23, 28, 71).

4.3.4.3. Comparação do perfil proteico entre grupos de resposta ao PROP

Os perfis proteicos bi-dimensionais foram estudados apenas para os grupos extremos de resposta ao PROP (ST e NT). Após análise dos géis 2D, os valores de percentagem de volume dos *spots* normalizados foram tratados estatisticamente. Os resultados obtidos mostram a existência de diferenças entre os grupos ST e NT, nos níveis de expressão de 23 *spots* proteicos (Figura 4.9; Tabela 4.6). Destes, 6 apresentaram diferenças estatisticamente significativas apenas em homens e 14 apenas em mulheres. 3 *spots* apresentaram diferenças entre grupos de resposta ao PROP em homens e mulheres, simultaneamente.

Dezanove dos 23 *spots* diferencialmente expressos entre grupos de diferente resposta ao PROP foram identificados com sucesso por espectrometria de massa. A informação relativa aos detalhes das identificações encontra-se na Tabela 4.6.

Os *spots* identificados, que diferem entre grupos de resposta ao PROP correspondem a diversas proteínas produzidas pelas 3 glândulas salivares maiores, nomeadamente cistatinas, zinco α -2 glicoproteína, região C das cadeias α -1 e α -2 de imunoglobulinas, actina citoplásmica 1, albumina, região C da cadeia K de imunoglobulinas, proteína induzida por prolactina (PIP) e inibidor de elastase de leucócitos.

Em 5 *spots* [identificados como região C da cadeia K de imunoglobulinas (*spot* 27), zinco α -2 glicoproteína (*spot* 44), actina citoplásmica (*spot* 46) e região C da cadeia α -1 de imunoglobulinas (*spots* 81 e 85)] foi observada interação significativa entre os fatores “grupo de resposta ao PROP” e “sexo”, o que significa que a variação dos níveis de expressão em função da capacidade de resposta ao PROP ocorre em sentido oposto em homens e mulheres: região C da cadeia K de imunoglobulinas (*spot* 27) apresentou expressão aumentada em homens ST, comparativamente a NT, enquanto nas mulheres foi o grupo NT que apresentou expressão mais elevada. O *spot* 46, identificado como actina citoplásmica, apresentou expressão mais elevada em homens NT, mas não em mulheres. O oposto foi observado nos dois *spots* correspondentes à proteína região C da cadeia α -1 de imunoglobulinas, apresentando expressão mais elevada em mulheres ST, mas não em homens. No caso do *spot* 44, identificado como zinco α -2 glicoproteína, os níveis de expressão, em homens, estão aumentados no grupo de indivíduos ST, enquanto nas mulheres o aumento observou-se no grupo de NT (figura 4.9).

Em homens, as proteínas cistatina SN (*spot* 15), actina citoplásmica 1 (*spot* 46) e PIP (*spot* 133) apresentaram uma expressão significativamente mais elevada no grupo NT, comparativamente ao grupo ST, enquanto que as proteínas região C da cadeia K de imunoglobulinas (*spot* 10 e 27), α -amilase (*spot* 82) e zinco α -2 glicoproteína (*spot* 44), encontraram-se aumentadas no grupo ST, comparativamente ao grupo NT (Tabela 4.6, figura 4.9).

No caso das mulheres, as proteínas zinco α -2 glicoproteína (*spot* 44), PIP (*spot* 33), inibidor de elastase de leucócito (*spot* 52), CA-VI (*spots* 62 e 63) e cistatina B (*spot* 97) apresentaram uma expressão mais elevada no grupo NT, comparativamente ao grupo ST, enquanto que a região C da cadeia α -1 de imunoglobulinas (*spots* 3, 81 e 85), região C da cadeia α -2 de imunoglobulinas (*spot* 86), albumina (*spot* 87) e região C da cadeia K de imunoglobulinas (*spot* 104) são proteínas com níveis de expressão aumentados em mulheres do grupo ST, comparativamente ao grupo NT (Tabela 4.6, figura 4.9).

Tabela 4.6 - Identificação por espectrometria de massa das proteínas diferencialmente expressas entre indivíduos ST e NT (saliva recolhida antes da estimulação com PROP)

Spot	Proteína	Referência de entrada <i>Uniprot</i>	MW (kDa) Estimado/ teórico	PI Estimado/ teórico	Score de identificação	C. Seq. (%)	Nº peptidos <i>matches</i>	% Volume (média ± erro padrão)		P
								<i>Supertaster</i>	<i>Nontaster</i>	
Homens										
10	Região C da cadeia K de imunoglobulina	P01834	25,9/11,8	6,8/5,6	67	50	4	0,78±0,12	0,33±0,05	0,002
15	Cistatina SN	P01037	13,4/16,6	5,8/6,73	118	60	8	3,34±0,53	6,53±1,09	0,020
27	Região C da cadeia K de imunoglobulina	P01834	25,9/11,8	5,6/5,58	68	50	4	0,31±0,05	0,13±0,01	0,005
30	n.i	-	41,0/-	5,9/-	-	-	-	0,06±0,01	0,09±0,01	0,043
42	n.i.	-	33,6/-	5,0/-	-	-	-	0,17±0,03	0,08±0,02	0,043

44	Zinco α -2 glicoproteína	P25311	41,0/34,4	5,4/5,7	188	45	14	0,29 \pm 0,04	0,17 \pm 0,05	0,046
46	Actina citoplasmica 1	Q96HG5	55,9/42,1	5,4/5,29	121	42	11	0,16 \pm 0,03	0,34 \pm 0,04	0,004
481	Região C da cadeia α -1 de imunoglobulinas	P01876	61,5/38,5	5,5/6,08	61	18	5	0,52 \pm 0,05	0,49 \pm 0,08	0,819
82	α -amilase	P04745	61,8/57,8	5,4/6,5	258	39	27	0,61 \pm 0,10	0,33 \pm 0,03	0,028
485	Região C da cadeia α -1 de imunoglobulinas	P01876	63,8/38,5	5,2/6,08	109	38	9	0,66 \pm 0,15	0,56 \pm 0,09	0,619
133	Proteína induzida por prolactina	P12273	15,7/16,8	4,8/8,26	110	45	7	0,19 \pm 0,03	0,36 \pm 0,07	0,048
Mulheres										
3	Região C da cadeia α -1 de imunoglobulinas	P01876	63,8/38,5	5,1/6,08	71	23	7	0,61 \pm 0,11	0,32 \pm 0,05	0,032
20	Recetor polimerico de imunoglobulina	P01833	88,1/84,4	5,4/5,58	108	17	11	0,66 \pm 0,07	0,37 \pm 0,02	0,002
27	Região C da cadeia K de imunoglobulinas	P01834	25,9/11,8	5,6/5,58	68	50	4	0,33 \pm 0,03	0,42 \pm 0,06	0,221

30	n.i.	-	41,0/	5,9/	-	-	-	0,06±0,01	0,09±0,01	0,051
33	Proteína induzida por prolactina	P12273	16,7/16,8	4,7/8,26	141	58	7	0,24±0,06	0,42±0,04	0,022
39	Imunoglobulina J	P01591	24,9/18,5	4,8/5,12	62	22	5	0,58 ± 0,12	1,04 ± 0,21	0,085
44	Zinco α-2 glicoproteína	P25311	41,0/34,4	5,4/5,7	188	45	14	0,06±0,01	0,17±0,04	0,047
46	Actina citoplasmica 1	Q96HG5	39,4/42,05	5,2/5,29	121	42	11	0,25±0,05	0,23±0,05	0,764
52	Inibidor de elastase de leucócito	P30740	41,0/42,8	5,6/5,9	152	34	11	0,06±0,01	0,13±0,01	0,001
62	Anidrase Carbónica VI	P23280	38,6/35,3	5,9/6,5	700	40	23	0,24±0,053	0,42±0,063	0,041
63	Anidrase Carbónica VI	P23280	37,9/35,3	6,0/6,5	306	39	5	0,11±0,15	0,27±0,26	0,000
81	Região C da cadeia α-1 de imunoglobulina	P01876	61,5/38,5	5,5/6,08	61	18	5	0,17±0,11	0,33±0,06	0,011

82	α -amilase	P04745	61,8/57,8	5,4/6,5	258	39	27	0,86 \pm 0,21	0,344 \pm 0,05	0,016
85	Região C da cadeia α -1 de imunoglobulina	P01876	63,8/38,5	5,2/6,08	109	38	9	1,15 \pm 0,19	0,43 \pm 0,05	0,003
86	Região C da cadeia α -2 de imunoglobulina	P01877	63,8/37,3	5,4/5,7	79	27	7	1,12 \pm 0,19	0,68 \pm 0,07	0,045
87	Albumina	Q86YG0	73,6/71,3	5,5/5,9	130	18	11	1,51 \pm 0,27	0,85 \pm 0,13	0,042
93	n.i.	-	25,4/	5,5/	-	-	-	0,05 \pm 0,02	0,23 \pm 0,05	0,029
97	Cistatina B	P04080	12,11/11,2	5,6/6,96	76	55	5	0,19 \pm 0,03	0,71 \pm 0,14	0,012
104	Região C da cadeia K de imunoglobulina	P01834	25,9/11,8	5,5/5,58	63	48	3	0,27 \pm 0,03	0,13 \pm 0,02	0,016

MW – massas moleculares (kDa); pI – ponto isoelétrico; (-) valores em falta por insucesso na identificação; Δ – Spots que, apesar de não estarem significativamente diferentes entre ST e NT, pela análise GLM apresentaram interação significativa entre o grupo de sensibilidade e o sexo. C.Seq. – cobertura de sequência (%)

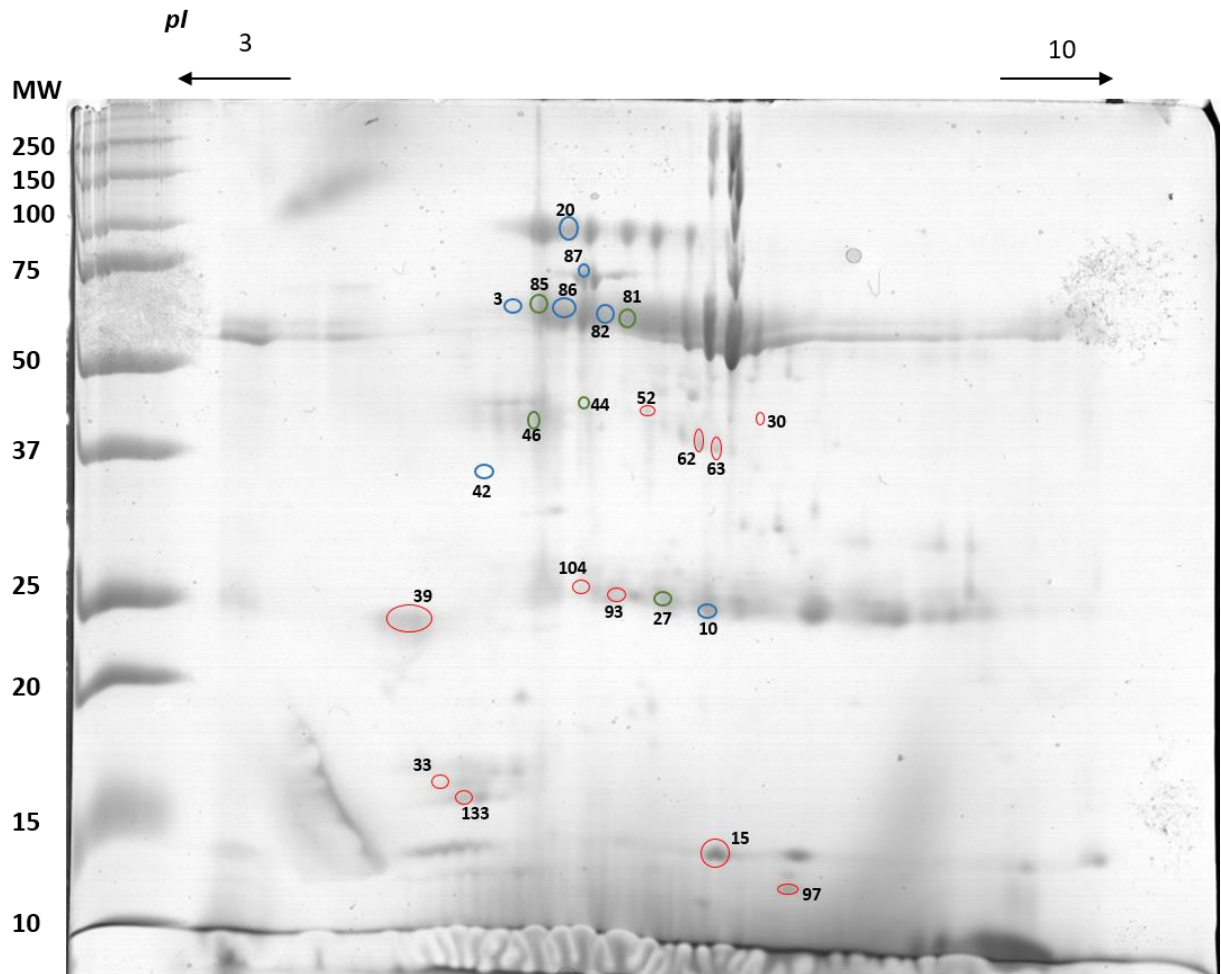


Figura 4.9 – Imagem representativa do perfil proteico salivar bidimensional, com representação de *spots* diferencialmente expressos entre grupos de diferente resposta para o amargo. *Spots* marcados a azul – expressão aumentada em indivíduos ST; *spots* marcados a vermelho – expressão aumentada em indivíduos NT; *spots* marcados a verde – *spots* para os quais se observou interação significativa entre o grupo de sensibilidade e o sexo. MW – massas moleculares (kDa); *pI* – ponto isoelétrico

Para além da comparação entre grupos de resposta ao PROP, foi avaliada a existência de correlação entre a intensidade percebida de PROP e a percentagem de volume dos *spots* em homens e mulheres, separadamente (figura 10A e 10B).

Em homens: **1)** foram observados 6 *spots* positivamente correlacionados com a resposta ao PROP (homens que percebem o PROP mais intensamente, apresentam maior expressão destes spots), nomeadamente *spots* 6, 21 e 42 (não identificados) e

spots 10 e 55 (região C da cadeia K de imunoglobulinas), *spot* 82 (α -amilase).; **2)** 3 *spots* apresentaram uma correlação negativa com a intensidade percebida de PROP (homens que perceberam o PROP mais intensamente, apresentaram menor expressão destes *spots*), nomeadamente *spot* 15 (cistatina SN), *spot* 30 (não identificado) e *spot* 46 (actina citoplasmica 1) (figura 4.9; figura 4.10A).

Relativamente às mulheres: **1)** 6 *spots* estavam positivamente correlacionados com a intensidade percebida de PROP, nomeadamente os *spots* 20 e 85 (recetor polimérico de imunoglobulina), *spots* 81 e 104 (região C da cadeia α -1 de imunoglobulina), *spot* 82 (α -amilase) e *spot* 87 (albumina); **2)** 3 *spots* estavam negativamente correlacionados com a intensidade percebida de PROP, nomeadamente, os *spots* 44 (zinco α -2 glicoproteína), 93 (não identificado) e 97 (identificado como cistatina B) (figura 4.9; Figura 4.10B).

A proteína região C da cadeia K de imunoglobulina foi a única que apresentou uma correlação moderada positiva com a intensidade percebida de PROP em homens e mulheres, simultaneamente.

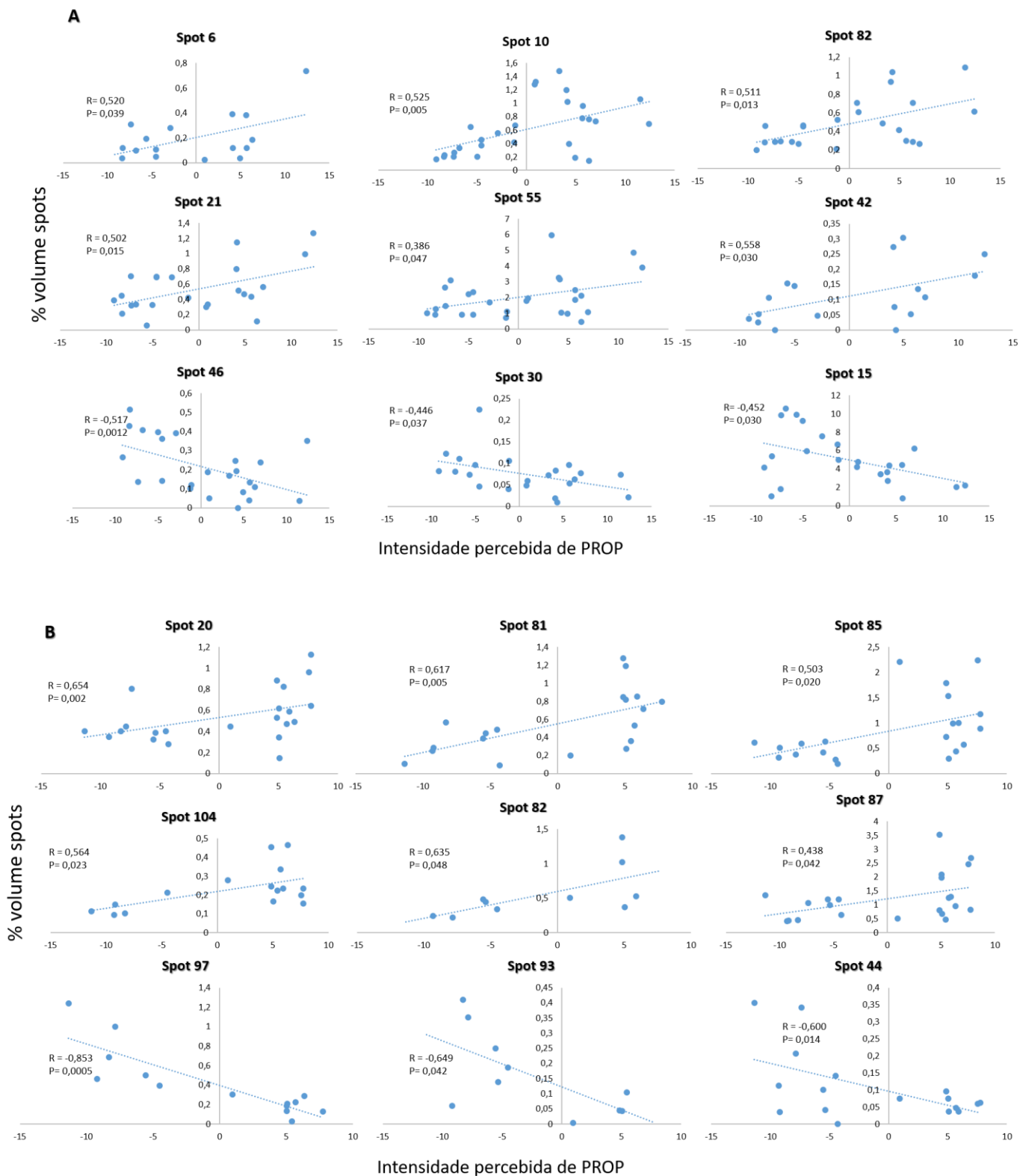


Figura 4.10 – Gráficos da relação significativa entre a expressão proteica (% volume dos *spots*) e a intensidade percebida de PROP em homens (A) e mulheres (B). As diferenças são significativas para $P < 0,05$.

4.3.5- Comparação entre ST e NT para variações no perfil proteico 2-DE da saliva entre os períodos antes e depois do estímulo

Todos os *spots* observados como estando diferencialmente expressos após estimulação com PROP foram identificados com sucesso por espectrometria de massa. A informação relativa ao detalhe das identificações de proteínas diferencialmente expressas após estimulação, encontra-se descrita na tabela 4.7 e a localização dos *spots* no perfil proteico encontra-se na figura 4.11.

A proteína α -amilase salivar, identificada em 5 *spots* diferentes (*spots* 70, 73, 79, 205, 204) apresentou alterações nos níveis de expressão (% volume *spots*) após a estimulação, consoante o grupo de sensibilidade. Indivíduos ST apresentaram uma diminuição dos níveis de expressão dos *spots* correspondentes a esta proteína após a estimulação com PROP. No *spot* 70, apesar das diferenças não serem estatisticamente significativas em indivíduos ST, os valores da média mostraram tendência para uma diminuição da expressão após estimulação. No caso de indivíduos NT, a diminuição da expressão só se observou no *spot* 79.

No caso das proteínas identificadas como recetor polimérico de imunoglobulina (*spot* 20) e região C da cadeia K de imunoglobulina (*spot* 56), observou-se uma diminuição da expressão após a estimulação, quer em indivíduos ST, quer em NT.

Para a proteína cistatina, observada por *Western Blot*, como respondendo à estimulação com PROP de forma diferente em ST e NT, observaram-se alterações significativas de expressão, entre as salivas recolhidas antes e após estimulação, para alguns *spots*. Os *spots* 25 (cistatina S) e 97 (cistatina B) apresentaram um aumento e uma diminuição significativos, respetivamente, após a estimulação com PROP. No entanto, de forma oposta aos resultados obtidos por *Western Blot*, as alterações foram no mesmo sentido em ST e NT.

Tabela 4.7- Identificação por espectrometria de massa das proteínas diferencialmente expressas entre ST e NT antes e depois do estímulo

Spot	Proteína	Referência de entrada <i>Uniprot</i>	MW (kDa) Estimado/teórico	PI Estimado/teórico	Score de identificação	C. Seq. (%)	Nº peptídeos <i>matches</i>	ST % Volume (média ± erro padrão)		NT % Volume (média ± erro padrão)			
								Antes	Depois	P	Antes	Depois	P
Total de indivíduos													
20	Receptor polimerico de imunoglobulina	P01833	88,1/84,4	5,4/5,58	108	17	11	0,93±0,21	0,39±0,12	0,91±0,23	0,47±0,14	0,053	0,020
23	Região C da cadeia K de imunoglobulina	P01834	26,4/11,7	5,9/5,6	45	48	3	0,96±0,25	0,28±0,04	0,35±0,09	0,70±0,26	0,039	0,203
♦25	Cistatina S	P01036	13,4/16,5	4,9/4,95	127	67	8	8,40±3,13	12,42±3,22	7,89±1,61	13,60±4,24	0,241	0,390
•56	Região C da cadeia K de imunoglobulina	P01834	25,9/11,7	6,8/5,58	64	50	4	1,60±0,28	0,83±0,22	1,30±0,20	0,89±0,19	0,078	0,178
•69	Receptor polimerico de imunoglobulina	P01833	91,4/84,4	6,8/5,6	108	17	11	0,90±0,24	0,37±0,55	0,92±0,41	0,40±0,11	0,065	0,212
70	α-amilase	P04745	61,6/57,7	6,0/6,5	1140	60	49	3,75±1,68	0,39±0,15	0,394±0,11	0,923±0,09	0,133	0,015
73	α-amilase	P04745	57,3/58,4	6,0/6,5	138	35	16	0,99±0,24	0,46±0,17	1,27±0,31	0,87±0,27	0,01	0,122
79	α-amilase	P04745	61,5/58,4	6,6/6,5	111	47	22	0,49±0,15	0,69±0,23	1,40±0,32	0,39±0,08	0,485	0,048

86	Região C da cadeia α -2 de imunoglobulina	P01877	63,8/37,3	5,4/5,7	79	27	7	1,37 \pm 0,22	0,72 \pm 0,15	0,026	-	-	-
97	Cistatina B	P04080	12,11/11,2	5,6/6,96	76	55	5	0,49 \pm 0,13	0,25 \pm 0,06	0,063	1,03 \pm 0,02	0,43 \pm 0,16	0,09
204	α -amilase	P04745	61,6/58,4	6,1/6,47	115	23	12	1,01 \pm 0,13	0,44 \pm 0,09	0,002	-	-	-
205	α -amilase	P04745	57,3/57,7	6,1/6,5	832	62	48	0,51 \pm 0,13	0,13 \pm 0,05	0,018	-	-	-

•A expressão só é significativa entre os períodos antes e depois considerando o total de indivíduos de ambos os grupos de resposta ao PROP (ST+NT); (-) Não existe N suficiente para a análise.

♦♦ no caso do spot 25 as diferenças entre períodos não foram estatisticamente significativas, ainda que se tenha observado uma tendência para níveis de expressão mais elevados, particularmente nos indivíduos NT.

C.Seq. – cobertura de sequência (%);

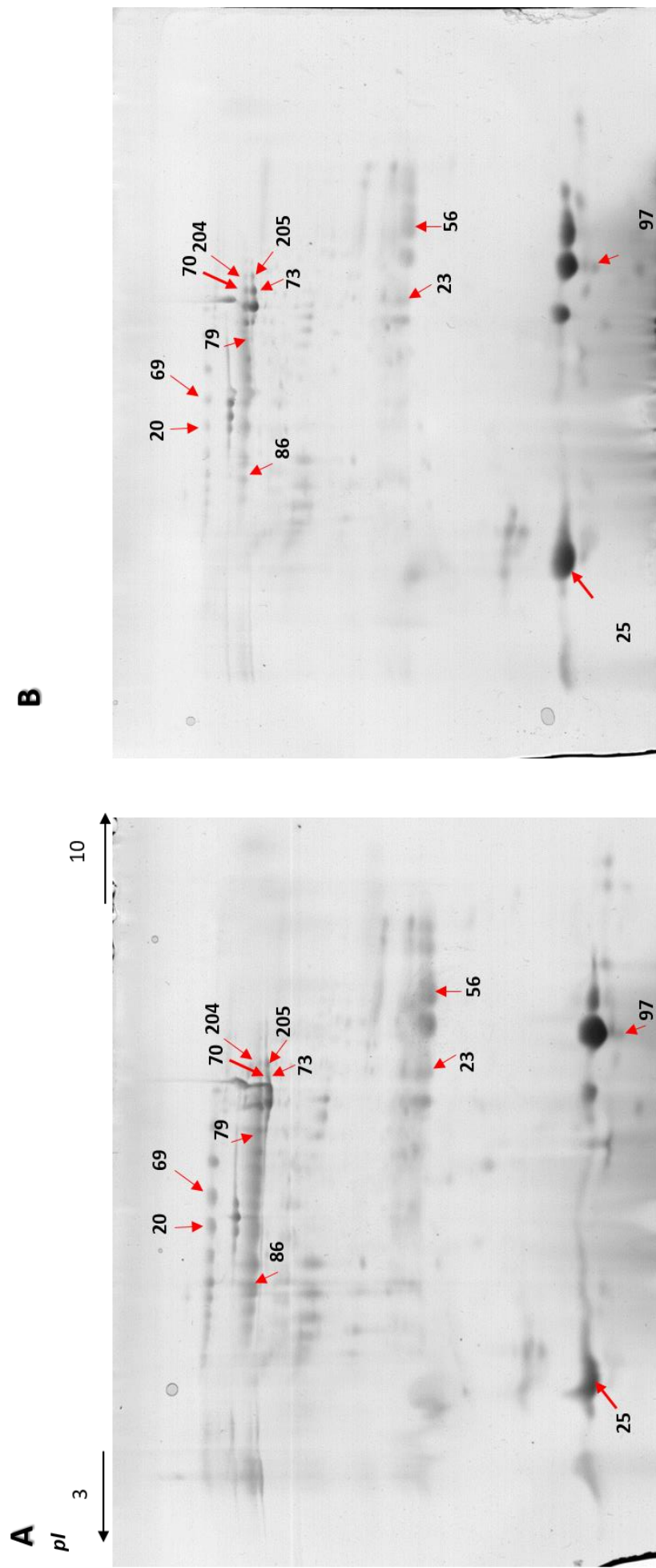


Figura 4.11 - Imagens representativas do perfil proteico bidimensional de saliva recolhida antes (A) e depois (B) da estimulação com o composto amargo PROP. As setas identificam spots diferencialmente expressos entre períodos de estimulação. *pI* – ponto isoeletrico.

4.3.6 Previsão de modificações pós-traducionais (PTMs)

Apesar do elevado número de *spots* proteicos identificados como diferencialmente expressos entre grupos de resposta ao PROP, entre sexos ou entre períodos de estimulação, muitos resultaram na mesma identificação. Além disso, foram também observadas diferenças entre as massas moleculares teórica e estimada e entre *pI* teórico e estimado para alguns *spots* cuja identificação resultou na mesma proteína, o que sugere que algumas proteínas podem apresentar diversas isoformas, provavelmente devido à presença de PTMs. Glicosilações e fosforilações são as duas PTMs mais comuns e são as principais responsáveis pelas maiores alterações observadas na massa molecular e *pI* de proteínas observadas em perfis bidimensionais. Devido a tal, foram utilizadas as aplicações FindMod, GlycoMod e NetPhos 2.0 para prever a presença de PTMs em proteínas identificadas por MS.

Foi efetuada a pesquisa de PTMs em 19 *spots*, os quais correspondem às proteínas região C da cadeia K de imunoglobulina (*spots* 10, 23, 56, 104), CA-VI (*spots* 28 e 63), proteína induzida por prolactina (*spots* 33 e 133), região C da cadeia α -1 de imunoglobulina (*spots* 3, 81 e 85) e α -amilase salivar (*spots* 58, 61, 72, 73, 74, 78 e 79). Em todos os *spots* foi observada a possibilidade de existirem glicosilações, ou seja, resíduos glucídicos associados à proteína, sendo os mais comuns oligossacarídeos ligados através do grupo hidroxilo de serina ou treonina (O-glyc), embora também se tenham observado oligossacarídeos ligados através do grupo amida de um resíduo de aspargina (N-glyc.). Todos os *spots* analisados apresentaram fosforilações, ou seja, observou-se a adição de um grupo fosfato nos aminoácidos serina, tirosinas ou treonina (Anexo V - tabela 1 suplementar).

4.4. Discussão

A sensibilidade para o gosto amargo tem sido relacionada com a aceitação, preferência e escolha dos alimentos, sendo que, neste contexto, a sua avaliação pode ser relevante em termos nutricionais.

Desde que o índice de massa corporal foi considerado um dos fatores com possível influência na acuidade gustativa (Donaldson *et al.*, 2009), este tem sido comparado entre indivíduos com diferente percepção gustativa. A relação entre a percepção do gosto amargo, principalmente para o composto PROP, e o IMC, tem sido alvo de vários estudos. Enquanto nalguns estudos não foi observada relação (Yackinous *et al.*, 2002; Drewnowski *et al.*, 2007), outros apresentaram uma relação significativa na qual indivíduos com IMC mais elevado apresentaram menor sensibilidade para o amargo, sendo que indivíduos ST apresentaram IMC mais baixo (Simchen *et al.*, 2006; Tepper *et al.*, 2008). No caso particular deste trabalho, tendo em conta o total de indivíduos, observou-se que o grupo de indivíduos com excesso de peso apresentaram maior percentagem de indivíduos MT e menor percentagem de indivíduos NT. Tem sido colocada a hipótese de que os diferentes resultados obtidos nos diferentes estudos podem estar relacionados com fatores que afetam o comportamento alimentar, como a restrição alimentar, e, conseqüentemente, o IMC (Tepper & Ullrich, 2002). O facto da obesidade poder estar relacionada com uma maior sensibilidade ao gosto amargo, pode conduzir a um menor consumo de alimentos com sabor amargo, como os vegetais, conduzindo a escolhas alimentares mais calóricas.

Foram identificados vários *spots* proteicos como estando diferencialmente expressos entre homens e mulheres, independentemente da resposta ao PROP. Comparando o perfil proteico de homens e mulheres, foram observados 12 *spots* diferencialmente expressos. Com efeito, os diferentes *spots* correspondem às proteínas região C da cadeia K de imunoglobulinas, actina citoplásmica, α -amilase salivar, recetor polimerico de imunoglobulinas e CA-VI. Dos 12 *spots* identificados, apenas um apresentou uma expressão significativamente mais elevada nos homens, nomeadamente uma isoforma da proteína actina citoplásmica, estando os restantes significativamente mais expressos em mulheres. Dos *spots* identificados como diferencialmente expressos entre homens e mulheres, sete correspondem a diferentes isoformas ou fragmentos da enzima α -amilase. Estas isoformas, com MW compreendida entre 32,9-61,5kDa e *pI* entre 5,9-6,8, apresentaram uma expressão significativamente mais elevada em mulheres, comparativamente a homens. Estas isoformas são resultado de modificações pós-traducionais, como glicosilação, fosforilação ou

processamento proteolítico. Tendo em consideração os resultados obtidos na separação proteica por SDS-PAGE, observaram-se igualmente diferenças entre homens e mulheres, sendo que as bandas identificadas como albumina e zinco α -2 glicoproteína apresentaram expressão significativamente mais elevada em mulheres, comparativamente a homens, enquanto a banda identificada como cistatina-SN apresentou expressão diminuída em mulheres, comparativamente a homens.

Escassos são os estudos onde se observou uma comparação entre o perfil proteico de homens e mulheres. Fleissing *et al.* (2010), compararam o perfil proteico da saliva entre homens e mulheres, observando seis proteínas com expressão significativamente mais elevada em mulheres, entre as quais o recetor polimérico de imunoglobulinas, tal como no presente trabalho. Uma justificação para as diferenças de expressão entre sexos pode estar relacionada com diferenças hormonais. Estudo recente de Gillum *et al.* (2014) mostrou que homens e mulheres diferem na expressão de proteínas salivares com atividade antimicrobiana, e com um papel na atividade imunológica, das quais se destaca a proteína imunoglobulina A, apresentando-se em níveis aumentados em mulheres com fase menstrual regular que não tomam contraceptivos hormonais, comparativamente aos homens. No entanto, mais estudos são necessários para compreender o mecanismo que leva à existência de diferenças na expressão de proteínas entre sexos.

No que diz respeito à relação entre perfis eletroforéticos salivares e IMC, observou-se uma correlação entre a proteína região C da cadeia K de imunoglobulina e o IMC, embora a mesma ocorra de forma oposta em homens e mulheres: mulheres que apresentaram IMC mais elevado, apresentaram menor expressão da proteína em causa, enquanto que os homens com IMC mais elevado apresentaram maior expressão desta proteína. O excesso de peso (pré-obesidade + obesidade) tem sido referido por diversos autores como estando associado a alterações no sistema imunitário. Pallaro *et al.* (2002) observaram níveis de imunoglobulinas salivares mais baixos em crianças obesas, comparativamente a pares normoponderais. Por outro lado, há referências a maior incidência de periodontite em indivíduos obesos (Dahiya *et al.*, 2012), sendo esta uma patologia associada a níveis aumentados de imunoglobulinas salivares (Shah *et al.*, 2010). Neste trabalho, apesar de terem sido considerados para o estudo apenas os indivíduos aparentemente saudáveis, não se pode excluir a existência de algum tipo de patologia oral que não seja visível no momento da recolha de saliva e que influencie alguns dos resultados obtidos. O motivo pelo qual estes resultados diferem entre homens e mulheres necessita de ser elucidado. No entanto, tal como foi referido nos resultados, homens e mulheres apresentaram diferenças nos níveis de imunoglobulinas

salivares, pelo que essas diferenças entre sexos podem levar a diferentes relações entre proteínas salivares e IMC, por parte de homens e mulheres.

A proteína CA-VI apresentou uma correlação negativa forte com o IMC em homens e mulheres. Lamy *et al.* (2015) também identificaram esta proteína como estando fortemente relacionada com o IMC em mulheres obesas, embora a relação seja no sentido inverso do obtido neste trabalho. O facto da proteína CA-VI ter apresentado, no presente trabalho, expressão aumentada em mulheres NT e homens ST, pode levar à hipótese de que a resposta ao gosto amargo pode determinar as escolhas alimentares, sendo que uma resposta mais elevada ao amargo pode determinar um menor consumo de alimentos saudáveis, como por exemplo vegetais, resultando no consumo de alimentos calóricos.

Variações na resposta ao composto amargo PROP têm sido as mais estudadas, sendo conhecidos polimorfismos associados ao recetor TAS2R38, os quais explicam uma elevada percentagem de variação, mas não o total (Genick *et al.*, 2011). Por esse motivo, possíveis influências da saliva, capazes de explicar alguma desta variação, começaram a ser estudadas.

Que seja do nosso conhecimento, a maior parte dos estudos com o objetivo de relacionar o proteoma salivar com a perceção do gosto amargo foi efetuada por duas equipas de investigadores, uma francesa e uma italiana, as quais testaram estímulos amargos diferentes, utilizando abordagens diferentes. No caso do composto PROP, um estudo de 2012 (Cabras *et al.*, 2012) referiu variações nos níveis de uma PRP básica entre indivíduos com diferentes perceções do amargo do PROP, não tendo observado diferenças para proteínas que foram referidas como envolvidas na sensibilidade ao amargo (ex. Dsamou *et al.*, 2012; Morzel *et al.*, 2014). Tendo em conta que estes autores utilizaram uma abordagem proteómica “gel free” é difícil saber se os diferentes resultados se devem ao facto do envolvimento de proteínas salivares na perceção do gosto amargo poder ser diferente para compostos amargos diferentes, ou antes a diferenças metodológicas. No presente trabalho, o objetivo principal consistiu na avaliação da relação entre a capacidade de resposta ao gosto amargo do PROP e o proteoma salivar, através de abordagens “gel-based”.

Embora o estudo de Cabras *et al.* (2012) apresente semelhanças com o apresentado neste capítulo em termos de desenho experimental, os participantes eram provenientes de uma população diferente, provavelmente com diferentes hábitos alimentares, o que pode influenciar a perceção gustativa (Ahrens, 2015). Além disso, neste estudo foi utilizada eletroforese bidimensional/MS como técnica de separação e

identificação proteica (por MALDI-FTICR-MS), enquanto no estudo de Cabras *et al* (2012), as proteínas salivares foram separadas e quantificadas por HPLC-ESI-IT-MS.

Tendo em conta os resultados obtidos a partir dos perfis eletroforéticos uni e bidimensionais, podemos afirmar que existe um conjunto de proteínas relacionadas com o fenótipo PROP (Tabela 4.6).

Os *spots* identificados como zinco α -2 glicoproteína, região C da cadeia α -1 de imunoglobulinas, região C da cadeia K de imunoglobulinas e actina citoplásmica 1, são *spots* que, apesar de estarem relacionados com a capacidade de resposta ao amargo em ambos os sexos, a sua relação com a resposta ao PROP foi oposta em homens e mulheres. É de destacar que, com exceção da zinco α -2 glicoproteína, todas as outras são proteínas para as quais algumas das formas proteicas, observadas nos géis 2-DE estavam diferentes entre homens e mulheres, o que pode influenciar esta diferente relação com a resposta ao PROP, observada para os diferentes sexos, tal como foi referido acima.

Estas proteínas têm sido relacionadas com o gosto amargo em estudos anteriores (Morzel *et al.*, 2014; Dsamou *et al.*, 2012). No caso do *spot* identificado como zinco α -2 glicoproteína, esta proteína tem um papel importante na fertilização, imunorregulação e adesão celular. Além disso, tem sido muito estudada devido ao seu papel no controlo da proliferação de tumores e mobilização de lípidos, na medida em que apresenta capacidade de ligação e transporte de diferentes ligandos, como lípidos, lipoproteínas e péptidos hidrofóbicos (Hassan *et al.*, 2008). Morzel *et al* (2014), referiram esta proteína como estando relacionada com baixa aceitação para o gosto amargo da ureia, ou seja, com elevada sensibilidade para esse gosto, o que vai no sentido dos resultados obtidos, no presente trabalho, para os homens. Também Igarashi *et al.*, (2008) referiram níveis salivares mais baixos desta proteína em indivíduos com desordens gustativas, o que sugeriram poder relacionar-se com deficiências em zinco, o qual, por sua vez, tem sido frequentemente referido como necessário para uma correta perceção gustativa (Ikeda *et al.*, 2005).

Diversos *spots* identificados como região C da cadeia K de imunoglobulinas apresentaram uma expressão mais elevada em indivíduos ST, comparativamente a NT, tanto em homens como em mulheres. Este facto foi reforçado pela observação de uma correlação moderada positiva entre a expressão desta proteína e a intensidade percebida de PROP.

Ainda que nos perfis SDS-PAGE a proteína região C da cadeia K de imunoglobulina tenha sido identificada numa banda (banda H) cuja expressão apresentou valores mais elevados apenas em mulheres NT (o que poderia parecer

contraditório aos resultados obtidos por 2-DE), essa banda continha também outra proteína identificada (granulo de zimogénio). Num estudo prévio, a proteína região C da imunoglobulina K, foi também reportada como sendo mais abundante na saliva de homens supersensíveis ao amargo da cafeína, comparativamente a homens pouco sensíveis (Dsamou *et al.*, 2012).

A proteína actina citoplásmica 1 é uma proteína característica do citoesqueleto das células. A sua presença na saliva é conhecida, ainda que a sua função não seja clara. Que seja do nosso conhecimento, referencias a uma associação entre os níveis desta proteína na saliva e percepção oral foi apenas observada em animais (ruminantes), em que houve um aumento de actina citoplásmica 1 em resposta ao consumo de compostos adstringentes (Lamy *et al.*, 2011).

Considerando a proteína PIP, estudos recentes sugeriram que esta proteína apresentou uma possível correlação com a aceitação do gosto amargo (ou seja, baixa sensibilidade gustativa) (Morzel *et al.*, 2014), o que está de acordo com os resultados apresentados neste capítulo, onde se observou uma expressão mais elevada desta proteína em indivíduos NT. Esta proteína salivar, apesar de ainda não ter a sua função completamente definida, desempenha um papel importante na regulação do sistema imunológico e atividade antibacteriana, estando também envolvida na formação do película que reveste os dentes (Hassan *et al.*, 2009). Os níveis elevados de PIP em indivíduos NT ou com elevada tolerância ao amargo, juntamente com estudos que reportaram um aumento desta proteína após a estimulação com estímulos aversivos (Lorenz *et al.*, 2011), levam à hipótese que a secreção de PIP pode, de alguma forma, responder a sensações orais aversivas.

A proteína albumina, presente principalmente no plasma, entra na cavidade oral através do fluido crevicular gengival. No presente estudo, esta proteína foi identificada como apresentando uma expressão significativamente mais elevada na saliva de mulheres ST, bem como uma correlação positiva com a intensidade percebida de PROP. Estes resultados são concordantes com os obtidos no estudo de Dsamou *et al.* (2012), no qual foi observada uma expressão significativamente mais elevada na saliva de indivíduos muito sensíveis ao amargo da cafeína. Níveis elevados de albumina são normalmente associados a certas patologias orais, como gengivite ou periodontite (Henskens *et al.* 1993; Gonçalves *et al.* 2010).

As proteínas CA-VI e cistatinas, identificadas em outros estudos como estando associadas ao gosto amargo, foram também observadas como estando relacionadas com a capacidade de resposta a este gosto básico, no presente estudo. Embora a sua função completa permaneça ainda por elucidar, a proteína CA-VI salivar participa na manutenção do pH homeostático no interior da cavidade oral e trato digestivo superior

(Henkin *et al.*, 1975). Esta proteína foi reportada como um fator trófico no crescimento e desenvolvimento dos gomos gustativos (Henkin *et al.*, 1999), sendo que carências nesta proteína foram associada com uma percepção gustativa diminuída (Shatzman & Henkin, 1981). Porém, existem controvérsias acerca da relação entre esta proteína e a percepção gustativa, sendo que alguns estudos não encontraram associação entre esta relação (Feeney & Hayes, 2014; Barbarossa *et al.*, 2015). Considerando apenas o período antes da estimulação, a análise *western Blot* revelou diferenças significativas entre grupos de resposta ao PROP, em ambos os sexos. Assim, as mulheres NT apresentaram uma expressão mais elevada comparativamente a ST, enquanto nos homens, foram os indivíduos ST que apresentaram um aumento significativo de expressão. Tendo em conta os perfis bidimensionais, dois *spots* de CA VI apresentaram níveis de expressão aumentados em mulheres NT, comparativamente a ST. O facto de nos perfis bidimensionais não se observarem níveis de expressão mais elevados nos homens ST, comparativamente a NT, enquanto que os resultados obtidos por *Western Blot* mostraram essas diferenças significativas, pode estar relacionado com o facto dos resultados obtidos através de *Western Blot* dizerem respeito à imunomarcação de uma banda contendo todas as isoformas de CA-VI, com as mesmas massas moleculares. Os resultados obtidos para os homens estão de acordo com um estudo recente em que esta proteína se encontrava em níveis mais elevados na saliva de crianças com baixa aceitação para o amargo, o que os autores consideraram corresponder a uma maior sensibilidade a este gosto (Morzel *et al.* 2014). Uma vez mais, esta é uma proteína para a qual homens e mulheres apresentaram diferenças nos níveis de expressão de um dos *spots* proteicos. Esta diferença entre sexos poderá contribuir para os resultados referidos. No entanto, em termos de resposta ao estímulo (avaliada pela comparação da saliva recolhida antes e depois da estimulação com PROP), homens e mulheres apresentaram em comum o facto de, em indivíduos ST, se observarem decréscimos significativos desta proteína, não acontecendo o mesmo em NT. Que seja do nosso conhecimento, poucos estudos avaliaram alterações na expressão de proteínas salivares após estimulação com composto amargo (Neyraud *et al.*, 2006; Lorenz *et al.*, 2011), incluindo estimulação com PROP (Cabras *et al.*, 2012). Apenas no estudo realizado por Lorenz *et al.* (2011), em que avaliaram alterações no perfil proteico salivar após estimulação com o composto 6-gingerol, foi observado um aumento de expressão da proteína CA-VI após a estimulação.

Em estudos anteriores, as cistatinas salivares foram reportadas como sendo mais abundantes em homens pouco sensíveis ao gosto amargo da cafeína (Dsamou *et al.*, 2012), bem como em crianças com elevada aceitação para este gosto (ou seja,

provavelmente menos sensíveis ao amargo) (Morzel *et al.*, 2014). As cistatinas são inibidores de proteases de cisteína e participam no controlo da proteólise no interior da cavidade oral, através da formação de complexos reversíveis com as proteases de cisteína (Bobek & Levine, 1992). Níveis de expressão elevados desta proteína, na saliva, foram sugeridos como estando relacionados com baixos níveis de proteólise, a qual pode afetar a película mucosa que reveste a cavidade oral, reduzindo a acessibilidade das moléculas do gosto para os respetivos recetores (Dsamou *et al.*, 2012). No presente estudo, observam-se diferenças nos níveis de expressão de cistatinas, através das diferentes metodologias utilizadas. Através de *Western Blot*, foi observada uma expressão mais elevada de cistatinas na saliva de homens NT, comparativamente a ST, embora esta diferença se observe apenas para o período após a estimulação com PROP. Esta relação entre níveis de expressão e resposta ao PROP foi também observada através dos perfis proteicos bi-dimensionais, onde um dos *spots* identificados como correspondendo a cistatina SN apresentou níveis de expressão mais elevados em homens NT, comparativamente a homens ST. Nas mulheres um outro *spot* proteico, identificado como cistatina B, também apresentou níveis de expressão mais elevados em indivíduos NT. É curioso observar que as isoformas de cistatinas relacionadas com a resposta ao composto PROP são diferentes em homens e mulheres (homens – cistatinas SN e mulheres cistatina B). O motivo pelo qual isto acontece precisará de ser elucidado em estudos futuros. As diferenças mais marcadas entre ST e NT, relativamente aos níveis de cistatinas, observaram-se em termos de resposta à estimulação com PROP, em direções opostas para ST e NT. Olhando para a comparação dos perfis bi-dimensionais da saliva recolhida antes e depois do estímulo, é possível observar que são diferentes as isoformas de cistatinas que aumentam e as que diminuem: cistatina B (*spot* 97) diminui, enquanto a cistatina S (*spot* 25) apresentou uma tendência para um aumento em NT.

Apesar da diversidade na sua estrutura, todos os membros da superfamília das cistatinas têm a propriedade de inibição de proteases de cisteína em comum, sugerindo conservação da sua função biológica (Bobek & Levine, 1992). No entanto, as cistatinas salivares apresentam diferenças na capacidade de inibição de proteases, indicando que cada cistatina salivar pode ter uma protease-alvo específica ou então que a sua capacidade de inibição de proteases não é a sua função principal. Estudos anteriores concluíram que a cistatina SN foi aquela que apresentou capacidade mais elevada na inibição de cisteínas (Baron *et al.*, 1999). As diferentes cistatinas salivares identificadas são agrupadas em três famílias: I (cistatinas intracelulares), II (cistatinas extracelulares) e III (cistatinas intravasculares) (de Sousa-Pereira *et al.*, 2013). As cistatinas B e SN

pertencem a famílias diferentes, I e II respetivamente. Pode assim especular-se que estas diferentes isoformas possam contribuir de forma diferente para a perceção de amargo. Num estudo de Neyraud *et al.* (2006), observou-se uma diminuição da expressão de cistatina S após forte estimulação com o composto amargo $C_a(NO_3)_2$. Curiosamente, no estudo realizado por Cabras *et al.* (2012), não foram reportadas variações nos níveis de cistatinas presentes antes e depois da estimulação. Embora o estudo de Cabras *et al.* (2012) apresente semelhanças com o apresentado neste capítulo em termos de desenho experimental, os participantes eram provenientes de uma população diferente, provavelmente com diferentes hábitos alimentares, o que pode influenciar a perceção gustativa (Lanfer *et al.*, 2013), realçando a importância do cuidado que é necessário ter aquando da análise de resultados acerca dos fatores envolvidos na perceção gustativa entre culturas diferentes.

Ainda que a proteína α -amilase salivar não tenha apresentado diferenças entre indivíduos ST e NT, nem na saliva recolhida antes, nem na recolhida depois do teste sensorial com PROP, os seus níveis de expressão apresentaram alterações após a estimulação. Dos cinco *spots* identificados como correspondendo a esta proteína, quatro diminuíram após o estímulo, em indivíduos ST. Estes *spots* apresentaram pequenas variações de massa molecular, sendo as maiores variações em termos de *pI*. Essas diferenças poderão dever-se a diferenças nos resíduos glucídicos (no caso de glicosilação) ou de fosforilações (tabela suplementar 1), o que poderá contribuir para diferenças em termos de função da proteína, as quais não são completamente conhecidas (Hirtz *et al.*, 2005). Um dos aspetos interessantes é o facto de tanto a proteína amilase, como a proteína CA VI, ambas produzidas maioritariamente pelas glândulas salivares serosas (parótidas e glândulas salivares menores de von Ebner) (Culpe *et al.*, 2011; Boehlke *et al.*, 2015) serem proteínas cujos níveis de expressão diminuem após o estímulo amargo só nos indivíduos ST. Uma das hipóteses que se coloca é a do estímulo amargo resultar numa menor secreção de proteínas produzidas pelas glândulas salivares serosas, e dessa menor secreção ser mais marcada nos indivíduos que respondem mais fortemente ao estímulo amargo, ou seja, os ST. Esta hipótese é reforçada pelos resultados obtidos em termos de alteração da concentração proteica, pH e taxa de secreção salivar após estimulação. Com efeito, indivíduos ST apresentaram uma diminuição da concentração proteica total após a estimulação com PROP, ao mesmo tempo que apresentaram um aumento na taxa de secreção e pH salivar após estimulação. Estas alterações, após a estimulação, podem ser consequência de uma maior produção de fluido por parte da glândula parótida, provocado pelo estímulo aversivo, com consequente diluição das proteínas

provenientes desta glândula e diminuição da acidez salivar. Aumento na taxa de secreção salivar em resposta a estímulos aversivos, tem sido reportado (Guinard *et al.*, 1997).

A proteína identificada como recetor polimérico de imunoglobulina (PIgR) apresentou uma diminuição da expressão após indivíduos ST e NT terem contactado com o estímulo amargo do PROP (testes sensoriais). Na cavidade oral, esta proteína desempenha o papel de transporte da imunoglobulina A (IgA) através do epitélio secretor (Yamamoto *et al.*, 2015). A sua expressão é regulada por fatores imunomodulatórios, como interferão γ e interleucina 4 (Kimura *et al.*, 2008), sendo que, quando estes fatores atuam sinergicamente, há um aumento da expressão de PIgR (Loman *et al.*, 1999). Yamamoto *et al.* (2015), mostraram que a ingestão de hidratos de carbono não digeríveis leva a um aumento significativo da expressão de mRNA de PIgR na glândula submandibular e da concentração de IgA na saliva de ratos, o que mostra a relação desta proteína com a componente nutricional. Relativamente à ligação da mesma com a percepção do gosto amargo, apenas o estudo de Morzel *et al.* (2014) mostrou que esta proteína se encontra associada a uma baixa aceitação para o gosto amargo, o que vai de encontro aos resultados obtidos no presente capítulo. No entanto, o motivo da potencial relação entre esta proteína e a resposta ao gosto amargo do PROP continua por elucidar.

Devido ao facto de se ter recolhido saliva quase imediatamente após a estimulação, as modificações observadas no proteoma após a estimulação com o composto amargo, provavelmente resultaram da libertação de proteínas armazenadas em vesículas e não de uma nova síntese, pois na síntese de novas proteínas a passagem do retículo endoplasmático para os vacúolos condensados é um processo que demora aproximadamente 30 minutos (Neyraud *et al.*, 2006).

Neste trabalho foi ainda avaliado a presença de modificações pós-traducionais presentes em algumas das proteínas identificadas como diferencialmente expressas entre grupos de resposta ao PROP, nomeadamente nas proteínas região C da cadeia K de imunoglobulina, CA-VI, PIP e região C da cadeia α -1 de imunoglobulinas. A proteína α -amilase salivar, observou-se como diferencialmente expressa entre sexos e foi identificada em 7 *spots* diferentes.

Observou-se que as proteínas identificadas em diferentes *spots* apresentaram variação no *pI* e massa molecular, podendo essa variação ser resultado de glicosilações e fosforilações que acontecem durante o processo de síntese proteica. Glicosilação é a mais importante e abundante modificação pós-traducional. Glicanos covalentemente

ligados a proteínas podem influenciar as suas propriedades físico-químicas, desempenhando papéis importantes em diversos processos biológicos, tais como no desenvolvimento embrionário, reconhecimento hormonal e interações célula-célula. Além disso, a presença de hidratos de carbono ligados a proteínas pode alterar a sua solubilidade, flexibilidade, estabilidade e capacidade de agregação (Temporini *et al.*, 2008). Neste estudo observou-se que as glicosilações mais comuns são as O-glicosilações, nas quais os açúcares se encontram ligados a resíduos de serina ou treonina.

A ligação covalente de um grupo fosfato a resíduos de serina, treonina ou tirosina é um processo dinâmico e reversível que regula diversas funções da proteína, tais como divisão celular, crescimento e diferenciação. Neste trabalho, observou-se que as fosforilações ocorrem, em ordem decrescente de probabilidade, em resíduos de serina, treonina e tirosina, sendo que uma proteína pode apresentar vários sítios de fosforilação, tal como descrito em estudos anteriores (Temporini *et al.*, 2008).

Tal como em estudos anteriores (Hirtz *et al.*, 2005), também aqui a proteína amilase salivar foi uma das que apresentou mais *spots* com variação na massa molecular e *pI*.

4.5. Conclusão

De acordo com os resultados obtidos no presente capítulo, é possível concluir que a composição da saliva se encontra relacionada com a resposta ao gosto amargo. No entanto, essa relação não é necessariamente a mesma em homens e mulheres. De entre as proteínas relacionadas com a resposta ao PROP, destacam-se a CA-VI, cistatinas, PIP e imunoglobulinas. No que diz respeito às duas primeiras, mais evidente do que os níveis em que elas estão presentes na saliva, num dado momento, é a resposta para a estimulação com este composto amargo. Ou seja, observaram-se mais diferenças entre indivíduos muito e pouco sensíveis ao PROP em termos de variação nos níveis desta proteína entre o antes e o depois do contacto com o estímulo. Estas observações levantam duas hipóteses: que estas proteínas poderão estar diretamente envolvidas com a sensibilidade gustativa e que, de alguma forma, interagem com o composto amargo PROP, alterando assim os níveis presentes após contacto com o mesmo; ou, por outro lado, que esta diferença entre os níveis antes e após o estímulo são o resultado de alterações na secreção salivar como resposta ao estímulo sensorial. Esta segunda hipótese é suportada pelo facto da taxa de secreção e pH sofrerem maiores alterações nos indivíduos com maiores níveis de resposta. Os maiores volumes

de saliva produzida pelos indivíduos mais responsivos, em conjunto com pH mais elevado, sugere aumento da secreção de fluido pelas glândulas parótidas, que pode resultar em maior diluição de alguns tipos de proteínas, nestes indivíduos mais sensíveis.

Por outro lado, a hipótese de interação de algumas proteínas salivares, como as PIP e cistatinas, com as moléculas do composto amargo não é de excluir, mas necessita de mais estudos para elucidar os mecanismos. A maior presença das isoformas destas proteínas com pontos isoelétricos mais baixos nos indivíduos pouco sensíveis (observada através de eletroforese bi-dimensional) pode relacionar-se com algum efeito das cargas na capacidade/incapacidade de ligação e/ou complexação das moléculas amargas.

Os diferentes resultados obtidos para homens e mulheres indicam a importância de considerar os dois sexos separadamente em estudos envolvendo dados salivares e sensoriais.

Capítulo 5

Relação entre a composição da saliva e a resposta ao gosto doce em adultos

5.1. Introdução

A percepção oral dos alimentos tem impacto na aceitação, escolha e preferência dos mesmos. O gosto doce está associado à aceitação e preferência inatas dos alimentos, funcionando como uma forma de sinalizar nutrientes, nomeadamente hidratos de carbono, associados a energia (Swithers *et al.*, 2010). Se em fases da história, em que períodos de abundância alimentar alternavam com períodos de escassez, uma maior sensibilidade para o gosto doce poderia ser uma vantagem evolutiva, nos dias de hoje, com a disponibilidade constante de alimentos calóricos, essa mesma sensibilidade poderá ser antes uma desvantagem, levando a um aumento de casos de obesidade associada a dietas ricas em alimentos com níveis elevados de gordura e açúcar (Drewnowski *et al.*, 1982; Simchen *et al.*, 2006). A preferência por alimentos doces e ricos em gordura está associado a pessoas obesas, sendo que a resposta positiva à gordura, que é mais elevada em pessoas obesas, torna-se ainda maior quando a gordura é doce (Donaldson *et al.*, 2009). Poucos estudos mostram associação entre os limiares do gosto doce e o peso corporal (Simchen *et al.*, 2006; Monneuse *et al.*, 2008), no entanto limiares de reconhecimento da sacarose foram reportados como significativamente menores em adolescentes com obesidade mórbida (Pasquet *et al.*, 2007).

Tal como referido no capítulo anterior (capítulo 4), há evidências cada vez mais fortes de que a composição da saliva está relacionada com a forma como os alimentos são percebidos na cavidade oral, nomeadamente com a sensibilidade gustativa. No entanto, a maior parte dos estudos acerca da influência do proteoma da saliva na percepção oral tem sido feito relativamente à sensação de adstringência (Dinnella *et al.*, 2009; de Freitas & Mateus, 2001) e ao gosto amargo (Wada *et al.*, 2010). Poucos estudos têm tentado relacionar os níveis de constituintes salivares com a percepção do gosto doce. Um estudo recente refere a existência de relação entre os níveis de amilase salivar e a pontuação para o gosto doce em crianças (Marquezin *et al.*, 2016). No entanto, que seja do nosso conhecimento, não há estudos que relacionem o proteoma salivar com a sensibilidade para o gosto doce.

Apesar do gosto doce estar associado a importantes funções biológicas, há um reduzido número de estudos com o objetivo de elucidar o papel da saliva na sua percepção, o que se pode dever ao facto de se assumir que os resultados obtidos com outros compostos amargos, nomeadamente PTC e PROP, possam ser extrapolados para os restantes gostos, uma vez que os níveis de resposta a esses compostos têm

sido aceites como “marcador” da sensibilidade de gostos e sensações orais em geral (Tepper, 2008). No entanto, há um número significativo de estudos que questionam esta relação. Drewnowski *et al.* (1997) reportaram uma fraca associação entre a sensibilidade gustativa para o PROP e a percepção do gosto doce, estando de acordo com um estudo recente, no qual demonstraram que PROP *nontasters* têm sensibilidade semelhante a PROP *tasters* para os restantes gostos básicos (Nagai *et al.*, 2014). Além disso, a possibilidade de conclusões respeitantes à sensibilidade para o gosto doce com base nas sensibilidades para outros gostos parece pouco provável, os diferentes gostos básicos são codificados por diferentes genes, sendo que o seu reconhecimento depende de diferentes vias de transdução de sinal (Bachmanov *et al.*, 2014).

O objetivo do presente estudo é avaliar a relação entre a sensibilidade para o gosto doce e a composição salivar, nomeadamente em termos de proteoma e níveis de glucose, uma vez que esta última estimula os recetores do gosto doce.

5.2. Materiais e métodos

5.2.1. Indivíduos em estudo

Os indivíduos que participaram na análise da relação entre a composição salivar e a percepção do gosto doce são os mesmos que se encontram referidos no capítulo 4 (N=159). Devido a tal, a descrição dos mesmos encontra-se no capítulo 4.

5.2.2. Estímulo gustativo, recolha de saliva e procedimento sensorial

Todas as soluções dos estímulos gustativos foram preparadas no dia anterior ao teste, através da dissolução de sacarose em água destilada, armazenadas a 4°C e colocadas à temperatura ambiente umas horas antes da realização do teste, de modo semelhante ao referido no capítulo 4. No início da sessão, todos os participantes lavaram a boca com água destilada. Seguidamente, foram instruídos para não engolirem, durante cinco minutos, e recolherem toda a saliva produzida na boca, por drenagem passiva, diretamente para um tubo de recolha colocado em gelo.

Para determinação do limiar do gosto doce, foram testadas 8 concentrações crescentes de sacarose (0,34g/L; 0,55g/L; 0,94g/L; 1,56 g/L; 2,59g/L; 4,32 g/L, 7,20g/L e 12 g/L, de acordo com as normas ISO 3972). Os indivíduos foram convidados a provar cada solução de sacarose e a referir se era similar ou diferente de água. A menor concentração identificada como diferente de água era considerada o limiar do doce.

As soluções foram provadas por ordem crescente de concentração. No início e entre cada conjunto de soluções, foi pedido aos participantes que lavassem a boca com água destilada.

5.2.3. Determinação dos níveis de glucose salivar

Os níveis de glucose salivar foram estimados através da utilização do Kit colorimétrico Glucose (GO) Assay (Sigma-Aldrich, Inc.), o qual se baseia na reação da glucose oxidase. O protocolo original fornecido pelo fabricante foi adaptado para microplacas, com os reagentes adicionados num volume proporcional ao recomendado para cada um deles, perfazendo um volume final de 280µL por poço. Em cada placa foram utilizados padrões de glucose com concentrações entre 2,5-30µg/mL. A absorvância foi medida a 560nm, num leitor de placas (Glomax, Promega).

Os níveis de glucose salivar foram avaliados numa subamostra de 91 indivíduos (47 homens e 44 mulheres), em duplicado.

5.2.4- Perfil proteico salivar

5.2.4.1- Perfis unidimensionais: SDS-PAGE

Amostras de saliva de 33 mulheres (20 sensíveis e 13 pouco sensíveis ao doce) e 41 homens (19 sensíveis e 22 pouco sensíveis ao doce) foram sujeitas a SDS-PAGE.

Cada amostra de saliva foi testada em triplicado. Um total de 7,5 µg de proteína de cada amostra de saliva de cada indivíduo foi corrida numa *lane*, num mini gel de 12% de poliacrilamida (Protean xi, Bio-Rad). A descrição do procedimento relativo à eletroforese unidimensional encontra-se no capítulo 4.

5.2.4.2. Eletroforese Bidimensional

Para os perfis proteicos bidimensionais foram analisadas 50 amostras, em duplicado, tendo em conta cada sexo individualmente e cada grupo experimental do gosto doce. Com efeito, foram considerados para análise géis de 23 amostras de mulheres (11 sensíveis e 12 pouco sensíveis, tendo em conta o gosto doce) e 27 de homens (14 sensíveis e 13 pouco sensíveis, tendo em conta o gosto doce). Para minimizar erros associados à própria técnica, cada amostra foi separada por eletroforese bi-dimensional em duplicado.

A avaliação da relação entre perfil proteico salivar e a sensibilidade para o gosto doce foi feita apenas numa fase, na qual foi utilizada saliva recolhida no período “antes” da estimulação com sacarose, ou seja, antes de realizarem os testes sensoriais descritos no ponto 5.2.2.

A descrição do procedimento relativo à eletroforese bidimensional e identificação de proteínas por MALDI FTICR MS, encontra-se no capítulo 4.

5.2.5. Atividade enzimática da α-amilase salivar

A atividade enzimática da proteína α-amilase salivar foi realizada de acordo com o *kit* Amylase Kinetic Enzyme Assay (Salimetrics®), num total de 87 amostras [46 homens (22 sensíveis e 24 pouco sensíveis ao doce) e 41 mulheres (20 sensíveis e 21 pouco sensíveis ao doce)]. Este método baseia-se na ligação do substrato cromogénico,

2-cloro-p-nitrofenol, com maltotriose. A enzima α -amilase salivar, nesta reação, reage com o substrato e produz 2-cloro-p-nitrofenol (PNP), o qual pode ser espectrofotometricamente medido a 405nm. O protocolo foi adaptado para microplacas de 96 poços, de acordo com as instruções do fabricante.

7 μ L das amostras de saliva (previamente diluídas com a solução diluente) foram pipetados para os poços da microplaca, seguindo-se a pipetagem de 280 μ L de solução substrato (previamente aquecida a 37°C). A placa foi de seguida incubada durante 1 minuto, a 37°C e com agitação a 500 rpm. Após o primeiro minuto é efetuada a primeira leitura a 405nm (Glomax, Promega). Seguidamente, a placa é incubada nas mesmas condições durante mais 2 minutos, sendo efetuada nova leitura a 405nm (Glomax, Promega).

A atividade enzimática foi expressa em números de moles de PNP formados por minuto, por mililitro de saliva(U/mL).

5.2.6. Análise estatística

Todos os dados foram analisados usando estatística descritiva e inferencial e a normalidade e homocedasticidade foram avaliadas através dos testes de Kolmogorov-Sminorff e Levene, respetivamente. Para avaliar diferenças entre sexos e IMC em termos de proporção de indivíduos pertencentes a cada grupo de perceção gustativa, foi efetuado o teste qui-quadrado. Para comparação dos parâmetros salivares (níveis individuais de expressão de bandas proteicas dos perfis SDS-PAGE, concentração de glucose e atividade da enzima α -amilase salivar), foi realizado o teste T-Student ou equivalente não paramétrico (Mann-Whitney). O coeficiente de correlação de Spearman foi utilizado para verificar a relação entre os limiares de sacarose e os parâmetros salivares.

Para a análise dos perfis bidimensionais, as variáveis foram testadas por Análise de Variância – de acordo com modelo geral linear (GLM) com 2 fatores fixos (grupo de sensibilidade gustativa e sexo). Para os *spots* que cumpriam os pressupostos de normalidade e homogeneidade de variâncias, os testes foram aplicados nos valores não transformados, enquanto para os dados que não cumpriam esses pressupostos, os testes foram realizados com os dados transformados (log).

As diferentes análises estatísticas foram realizadas através da utilização do software SPSS versão 22 (SPSS Inc., Chicago, USA) e as diferenças foram consideradas significativas para um intervalo de confiança de 95% (P<0,05).

5.3. Resultados

5.3.1. Sensibilidade gustativa de acordo com o sexo e IMC

Tendo em conta o gosto doce, os limiares de deteção da sacarose foram tidos em consideração para classificar os indivíduos de acordo com a sensibilidade. De modo a estabelecer grupos de sensibilidade, e tendo em conta a inexistência de normas para o fazer, no caso do gosto doce, seguiu-se a metodologia descrita num estudo realizado em crianças (Ahrens, 2015), considerando-se sensíveis (SS) ao doce os indivíduos cujos limiares são inferiores à concentração correspondente à mediana (7,2g/L sucrose) e como pouco sensíveis (PS) os indivíduos com limiares de deteção superiores ou iguais a esse valor.

Comparando homens e mulheres, em termos de limiares de deteção de sacarose, observou-se uma tendência ($P=0,051$) para limiares em média mais elevados em homens ($6,78\pm 0,45$ g/L sacarose), comparativamente a mulheres ($5,60\pm 0,34$ g/L sacarose). Através do teste do Qui-quadrado, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre homens e mulheres na proporção de indivíduos pertencentes a cada grupo de sensibilidade para o doce. No entanto, se considerarmos apenas os indivíduos normoponderais, há uma tendência ($P=0,160$) para maiores percentagens de mulheres sensíveis ao doce do que de homens: 40,5% dos homens são sensíveis e 59,5% pouco sensíveis ao gosto doce, enquanto para mulheres a proporção de indivíduos sensíveis foi de 54,1% e de pouco sensíveis de 45,9%.

Relativamente à comparação entre grupos de IMC (normoponderais vs. excesso de peso), não se observaram diferenças relativamente à percentagem de indivíduos pertencentes a cada grupo de sensibilidade para o doce. Ou seja, quer nos indivíduos normoponderais, quer naqueles que apresentam excesso de peso, as percentagens pertencentes a cada grupo de sensibilidade para o doce foram próximas (tabela 5.1).

Tabela 5.1 – Percentagem de indivíduos normoponderais e obesos pertencentes a cada grupo de sensibilidade para o doce.

		% indivíduos	
		« 25	> 25
Grupos de sensibilidade gustativa para o doce	Sensíveis	49,1	51,5
	Pouco sensíveis	50,9	48,5

5.3.2. Níveis de glicose salivar

Embora não tenham sido observadas diferenças significativas considerando o total de indivíduos (homens + mulheres), analisando os resultados tendo em conta o sexo separadamente, foi possível observar que mulheres pouco sensíveis ao doce apresentaram níveis de glicose salivar mais elevados ($6,01 \pm 1,43 \mu\text{g/mL}$), comparativamente a mulheres sensíveis ($2,57 \pm 0,33 \mu\text{g/mL}$) ($P=0,015$). Além disso, nas mulheres, os níveis de glicose estão positivamente correlacionados com os limiares de sacarose ($N=39$; $R=0,383$; $P=0,016$, coeficiente de correlação de *Spearman*) (Figura 5.1).

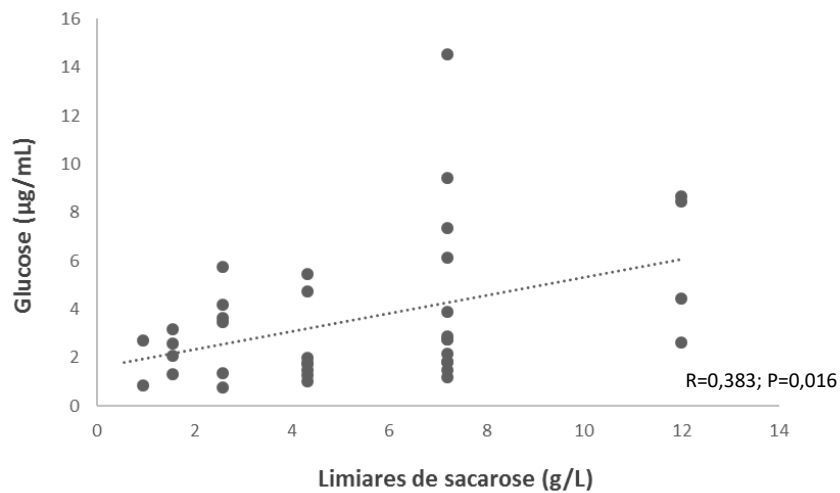


Figura 5.1- Gráfico da correlação significativa entre os níveis de glicose salivar e os limiares de sacarose em mulheres. As diferenças são significativas para $P < 0,05$.

Observou-se também que os níveis de glicose salivar não diferem entre indivíduos normoponderais ($3,26 \pm 0,27 \mu\text{g/mL}$) e com excesso de peso ($3,14 \pm 0,52 \mu\text{g/mL}$) ($P=0,826$).

5.3.3. Composição da saliva

5.3.3.1. Taxa de fluxo salivar, pH e concentração proteica total

Os indivíduos pertencentes a diferentes grupos de sensibilidade ao gosto doce não apresentaram diferenças significativas na taxa de secreção, pH e concentração proteica total salivares. Este resultado observou-se tendo em conta o número total de indivíduos (tabela 5.2). Mesmo fazendo a análise em separado para homens e mulheres, não se observaram diferenças, entre grupos de sensibilidade, para nenhum dos parâmetros referidos.

Tabela 5.2 – Comparação de parâmetros salivares (média \pm erro padrão) entre grupos de sensibilidade para o gosto doce. Estes valores referem-se ao total de indivíduos em estudo.

Número total de indivíduos (média \pm erro padrão)			
	Sensíveis	Pouco sensíveis	P
Concentração proteica ($\mu\text{g/mL}$)	446,07 \pm 21,55	458,98 \pm 19,95	0,662
Taxa de secreção salivar (mL/min)	0,52 \pm 0,03	0,57 \pm 0,03	0,191
pH	7,60 \pm 0,08	7,64 \pm 0,11	0,774

5.3.3.2. Perfil proteico unidimensional (SDS-PAGE)

Foram observadas diferenças no perfil proteico salivar SDS-PAGE entre indivíduos sensíveis e pouco sensíveis ao gosto doce, embora essas diferenças possam não ser as mesmas em homens e mulheres. Os homens pouco sensíveis ao doce apresentaram níveis de expressão das bandas identificadas como recetor Polimerico de Imunoglobulina (Banda C) e α -amilase (Bandas E e F) mais elevados que os homens sensíveis (figura 5.2). No caso destas últimas, a banda E diferiu significativamente, enquanto a banda F, correspondente à isoforma de amilase com menor massa molecular, apresentou apenas tendência para maiores níveis de expressão (figura 5.2). Nas mulheres, nenhuma das proteínas previamente mencionadas diferiu entre grupos de sensibilidade para o doce. No entanto, neste sexo, uma banda proteica com massa molecular aparente de 120kDa (Banda B), a qual não foi identificada, apresentou níveis de expressão mais elevados em mulheres pouco sensíveis, comparativamente a

sensíveis. Por sua vez, a banda identificada como cistatina-SN (Banda J) apresentou níveis de expressão mais baixos em mulheres pouco sensíveis (figura 5.2).

As bandas acima referidas encontram-se representadas na figura 5.3 e os detalhes relativos à identificação na tabela 5.3.

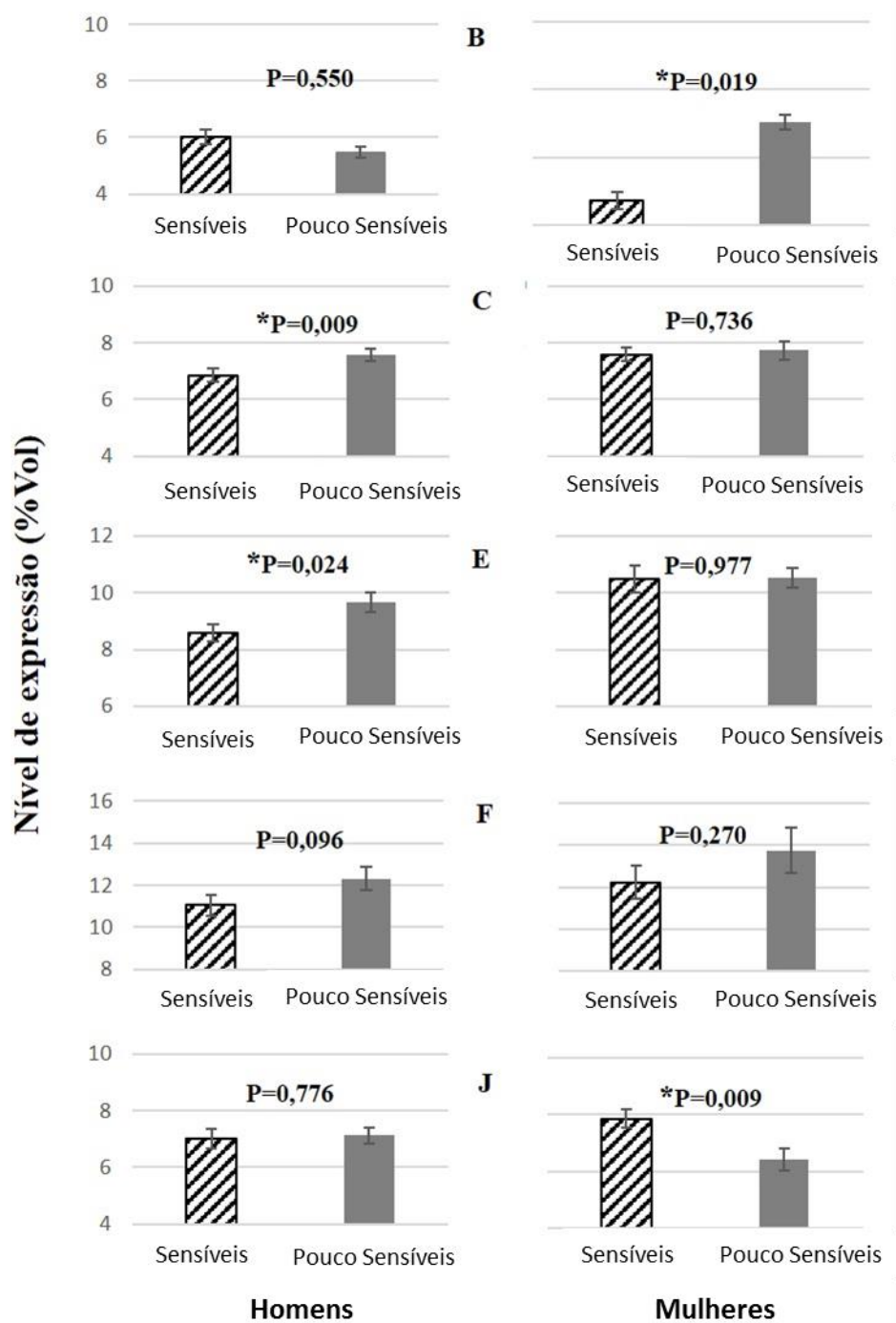


Figura 5.2- Nível de expressão (% Vol.) de bandas diferencialmente expressas entre indivíduos com diferente sensibilidade para o gosto doce. As letras B, C, E, F, J referem-se ao nome das bandas. * Diferenças são significativas para $P < 0,05$.

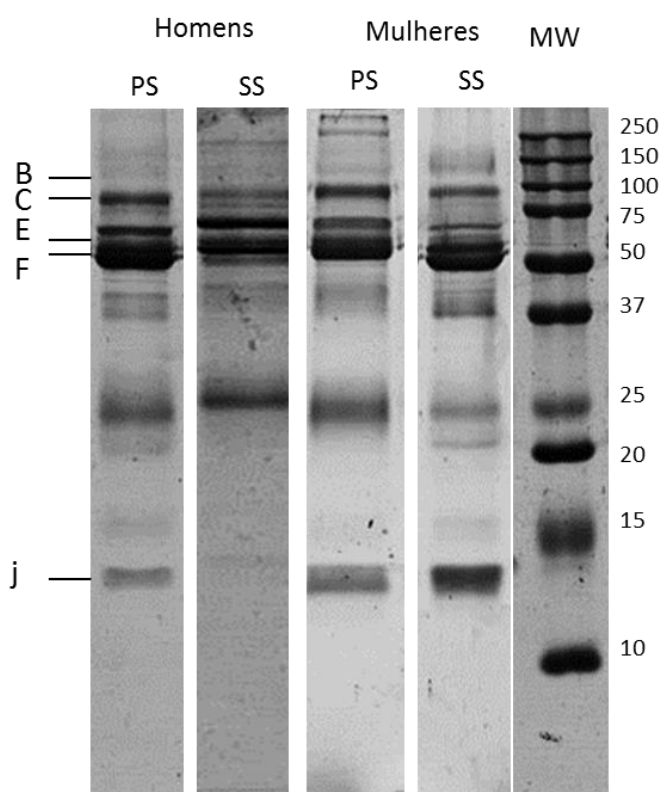


Figura 5.3- Imagem representativa de perfis proteicos obtidos por separação eletroforética unidimensional (SDS-PAGE). As bandas assinaladas referem-se àquelas para as quais se observam diferenças entre grupos de sensibilidade para o doce. PS- pouco sensíveis; SS- muito sensíveis; MW- Massas moleculares (kDa).

Tabela 5.3– Identificação das proteínas salivares diferencialmente expressas entre grupos de percepção gustativa, de acordo com os perfis proteicos SDS PAGE

Banda	Proteína	Referência de entrada <i>uniprot</i>	MW (kDa) Estimada/teórica	Score de identificação	Cobertura de sequência (%)	Nº peptídeos correspondentes
B	n.i.	-	120/-	-	-	-
C	Recetor polimerico de imunoglobulina	P01833	84,9/84,4	107	21	13
E	α -amilase 1	P04745	66,5/57,8	135	31	15
F	α -amilase 1	P04745	57,1/57,8	100	21	9
J	Cistatina-SN	P01037	14,4/16,6	99	60	7

n.i.- não identificado; (-) valores em falta devido a insucesso na identificação.

5.3.3.3. Atividade enzimática da α -amilase salivar

A atividade enzimática da proteína α -amilase salivar por volume de saliva (U/mL) não apresentou diferenças significativas entre os grupos de sensibilidade para o gosto doce, quando considerando homens e mulheres em conjunto. No entanto, tendo em consideração a taxa de fluxo salivar, e convertendo em valores de atividade enzimática por unidade de tempo, observou-se que os homens com menor sensibilidade para o doce apresentaram atividade enzimática por minuto (U/min), mais elevada. Este facto não foi observado em mulheres (figura 5.4).

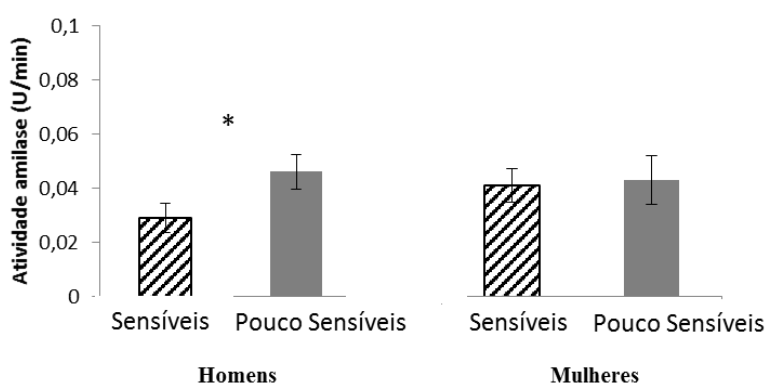


Figura 5.4 – Atividade enzimática da α -amilase salivar (U/min) em amostras de saliva mista de homens e mulheres com diferentes níveis de sensibilidade para o doce (Média \pm EPM). Diferenças são significativas para $P < 0,05$.

5.3.3.4. Perfil proteico bidimensional

Após análise dos géis bidimensionais, os valores de percentagem de volume dos *spots* normalizados foram tratados estatisticamente. Os resultados obtidos mostram a existência de diferenças entre grupos de sensibilidade para o gosto doce, nos níveis de expressão de 23 *spots* proteicos (Figura 5.5; Tabela 5.4). Destes, 8 apresentaram diferenças estatisticamente significativas apenas em homens e 10 apenas em mulheres.

Dezasseis dos 23 *spots* diferencialmente expressos entre grupos de sensibilidade foram identificados com sucesso por espectrometria de massa. A informação relativa aos detalhes das comparações e identificações encontra-se na Tabela 5.4.

Os *spots* identificados como estando relacionados com a sensibilidade para o gosto doce, ou no total de indivíduos, ou em cada um dos sexos separadamente,

correspondem a diversas proteínas produzidas pelas 3 glândulas salivares maiores, nomeadamente, proteína secretora rica em cisteína, α - amilase salivar, cistatinas, CA-VI, actina citoplásmica 1, região C da cadeia K de imunoglobulinas e proteína induzida por prolactina (PIP). Considerando os dois sexos em simultâneo, foram observados menores níveis de expressão das proteínas α - amilase salivar e CA-VI nos indivíduos sensíveis ao doce, enquanto que proteínas da família das cistatinas foram observadas como estando aumentadas neste grupo.

Para 3 *spots* [identificados como proteína secretora rica em cisteína 3 (*spot* 13), região C da cadeia K de Imunoglobulina (*spot* 55) e proteína induzida pela prolactina (PIP) (*spot* 31)] foi ainda observada uma interação significativa entre os fatores “grupo de sensibilidade gustativa” e “sexo”, o que significa que a variação dos níveis de expressão em função da sensibilidade para o gosto doce ocorre em sentido oposto em homens e mulheres: 1) região C da cadeia K de imunoglobulinas e Proteína secretora rica em cisteína 3 apresentou expressão aumentada em homens pouco sensíveis, comparativamente a sensíveis, enquanto nas mulheres foi o grupo das sensíveis que apresenta níveis mais elevados, comparativamente ao grupo de pouco sensíveis. Esta observação, de que a relação entre os níveis de região C da cadeia K de imunoglobulinas e a sensibilidade gustativa existe de forma oposta em homens e mulheres, foi reforçada pelo facto de se ter identificado esta proteína em outros 2 *spots* proteicos (7 e 27), sendo que um deles se observou aumentado em homens pouco sensíveis e o outro em mulheres sensíveis; 2) No caso do *spot* identificado como proteína PIP (*spot* 31), os níveis de expressão, em homens, estão aumentados no grupo de indivíduos sensíveis, embora esse aumento não seja significativo mas sim uma tendência (sensíveis: $0,33 \pm 0,09$; pouco sensíveis: $0,19 \pm 0,04$; $P=0,161$), enquanto nas mulheres o aumento observou-se no grupo de pouco sensíveis (tabela 5.4).

As proteínas actina citoplásmica 1 e albumina são proteínas diferencialmente expressas entre grupos de sensibilidade para o gosto doce apenas em homens. Os níveis de expressão observados para o *spot* identificado como actina citoplasmática 1 foram mais elevados nos homens pouco sensíveis, e os níveis de expressão do *spot* de albumina mais elevados em homens sensíveis. A tabela 5.4 resume os resultados referidos.

Tabela 5.4 – Identificação e comparação da expressão de spots proteicos entre os grupos de sensibilidade para o gosto doce

Spot	Proteína	Referência de entrada <i>Uniprot</i>	MW (kDa) Estimado/ teórico	PI Estimado/ teórico	Score de identificação	Cobertura de sequência (%)	Nº peptídeos correspondentes	% Volume (média ± erro padrão)		P
								Sensível	Pouco sensível	
Total de indivíduos (homens e mulheres)										
14	n.i.	-	30,4/-	6,4/-	-	-	-	0,13±0,05	0,35±0,05	0,005
26	n.i.	-	25,9/-	5,5/-	-	-	-	0,19±0,03	0,30±0,04	0,034
57	n.i.	-	29,8/-	6,1/-	-	-	-	0,08±0,03	0,19±0,03	0,014
63	Anidrase carbônica VI	P23280	38,6/35,5	5,9/6,51	71	19	5	0,22±0,05	0,39±0,04	0,013
64	Anidrase carbônica VI	P23280	37,8/35,5	6/6,51	55	19	5	0,14±0,02	0,21±0,02	0,031
Homens										
7	Região C da cadeia K de imunoglobulina	P01834	26,4/11,8	6/5,58	44	48	3	0,27±0,06	0,46±0,06	0,022
13	Proteína secretora rica em cisteína 3	P54108	31,0/28,5	7,0/8,09	51	17	4	0,14±0,02	0,24±0,03	0,005

19	Albumina	Q86YG0	73,7/71,3	5,6/5,92	132	28	15	0,95±0,16	0,49±0,09	0,015
25	Cistatina S	P01036	13,4/16,5	4,9/4,95	127	67	8	11,09±1,30	5,27±0,25	0,042
46	Actina citoplasmica 1	Q96HG5	55,9/42,1	5,4/5,29	121	42	11	0,16±0,03	0,29±0,05	0,035
66	α-amilase	P04745	43,6/58,4	5,6/6,47	146	25	13	0,04±0,01	0,08±0,02	0,003
68	n.i.	-	43,6/-	5,9/-	-	-	-	0,05±0,02	0,10±0,02	0,027
137	n.i.	-	27,5/-	6,4/-	-	-	-	0,13±0,03	0,23±0,03	0,049
Mulheres										
27	Região C da cadeia K de imunoglobulina	P01834	25,9/11,8	5,6/5,58	68	50	4	0,408±0,046	0,269±0,023	0,018
55	Região C da cadeia K de imunoglobulina	P01834	25,9/11,8	6,5/5,58	80	50	4	2,70±0,35	1,78±0,21	0,023
31	Proteína induzida por prolactina	P12273	16,4/16,8	5,2/8,26	154	55	9	0,21±0,06	0,39±0,06	0,037
43	n.i.	-	32,2/-	5,4/-	-	-	-	0,15±0,01	0,09±0,02	0,035

65	Anidrase carbônica VI	P23280	37,1/35,5	6,5/6,51	94	30	8	0,07±0,01	0,11±0,01	0,008
77	α-amilase 1	P04745	49,7/58,4	5,7/6,47	147	38	17	0,24±0,03	0,36±0,03	0,013
78	α-amilase 1	P04745	59,4/58,4	5,7/6,47	138	35	16	1,62±0,22	2,38±0,26	0,036
97	Cistatina B	P04080	12,11/11,2	5,6/6,96	76	55	5	0,65±0,16	0,18±0,02	0,018
120	α-amilase 1	P04745	49,6/58,4	6/6,47	177	32	13	0,07±0,01	0,11±0,02	0,051
124	n.i.	-	85,0/-	5,8/-	-	-	-	0,09±0,02	0,21±0,05	0,037

n.i.- Não identificado por espectrometria de massa; (-) valores em falta; MW – massas moleculares (kDa); *pI* - ponto isoelétrico

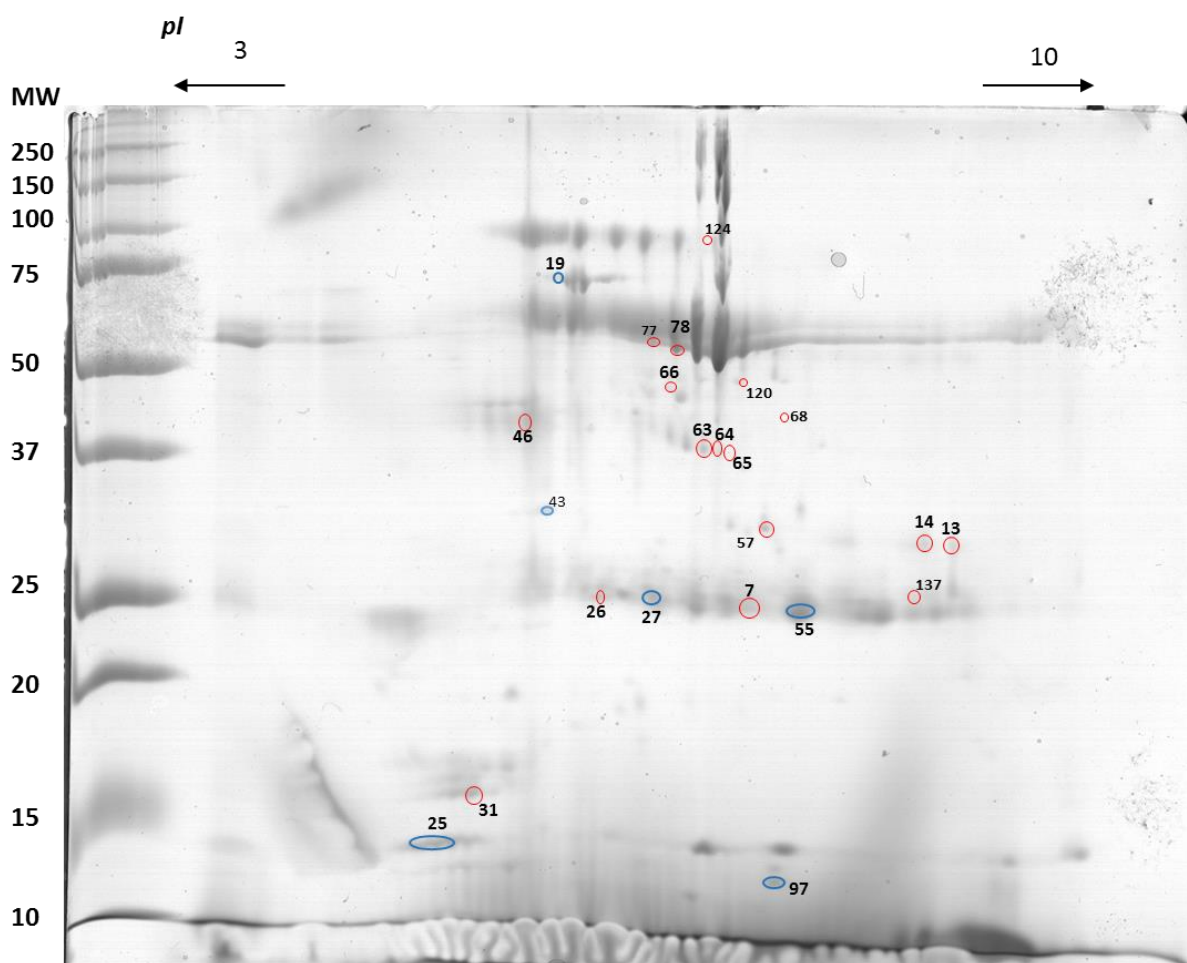


Figura 5.5 – Imagem representativa do perfil proteico salivar bidimensional, com representação de *spots* diferencialmente expressos entre grupos de sensibilidade gustativa para o doce. *Spots* a azul significam expressão proteica aumentada em indivíduos sensíveis; *spots* a vermelho significam expressão proteica aumentada em indivíduos pouco sensíveis. MW– massas moleculares (kDa); *pI* – ponto isoelétrico

Para além da comparação entre grupos de resposta ao PROP, foi avaliada a existência de correlação entre os limiares do gosto doce e a percentagem de volume dos *spots* no total de indivíduos, em homens e mulheres, separadamente (figura 5.6A, 5.6B, 5.6C).

No total de indivíduos: **1)** foram observados 2 *spots* positivamente correlacionados com os limiares do doce (indivíduos com limiares mais elevados, apresentaram maior expressão desses *spots*), nomeadamente *spots* 26 (não identificado) e 65 (CA-VI); **2)** 2 *spots* que apresentam uma correlação negativa com os limiares do doce (indivíduos com limiares mais elevados, apresentaram menor

expressão desses spots), nomeadamente spots 25 (cistatina S) e 48 (não identificado) (figura 5.6A).

Em homens: **1)** foram observados 3 spots positivamente correlacionados com os limiares de doce, nomeadamente spots 13 (proteína secretora rica em cisteína), 64 (CA-VI), e 66 (α -amilase); **2)** 1 spot apresentaram uma correlação negativa com os limiares de doce, nomeadamente o spot 10 (região C da cadeia K de imunoglobulina) (figura 5.6B).

Em mulheres: **1)** foram observados 2 spots positivamente correlacionados com os limiares de doce, nomeadamente spots 31 (PIP) e 77 (α -amilase); **2)** 3 spots apresentaram uma correlação negativa com os limiares de doce, nomeadamente os spots 27 (região C da cadeia K de imunoglobulina), 43 (não identificado) e 97 (cistatina-B) (figura 5.6C).

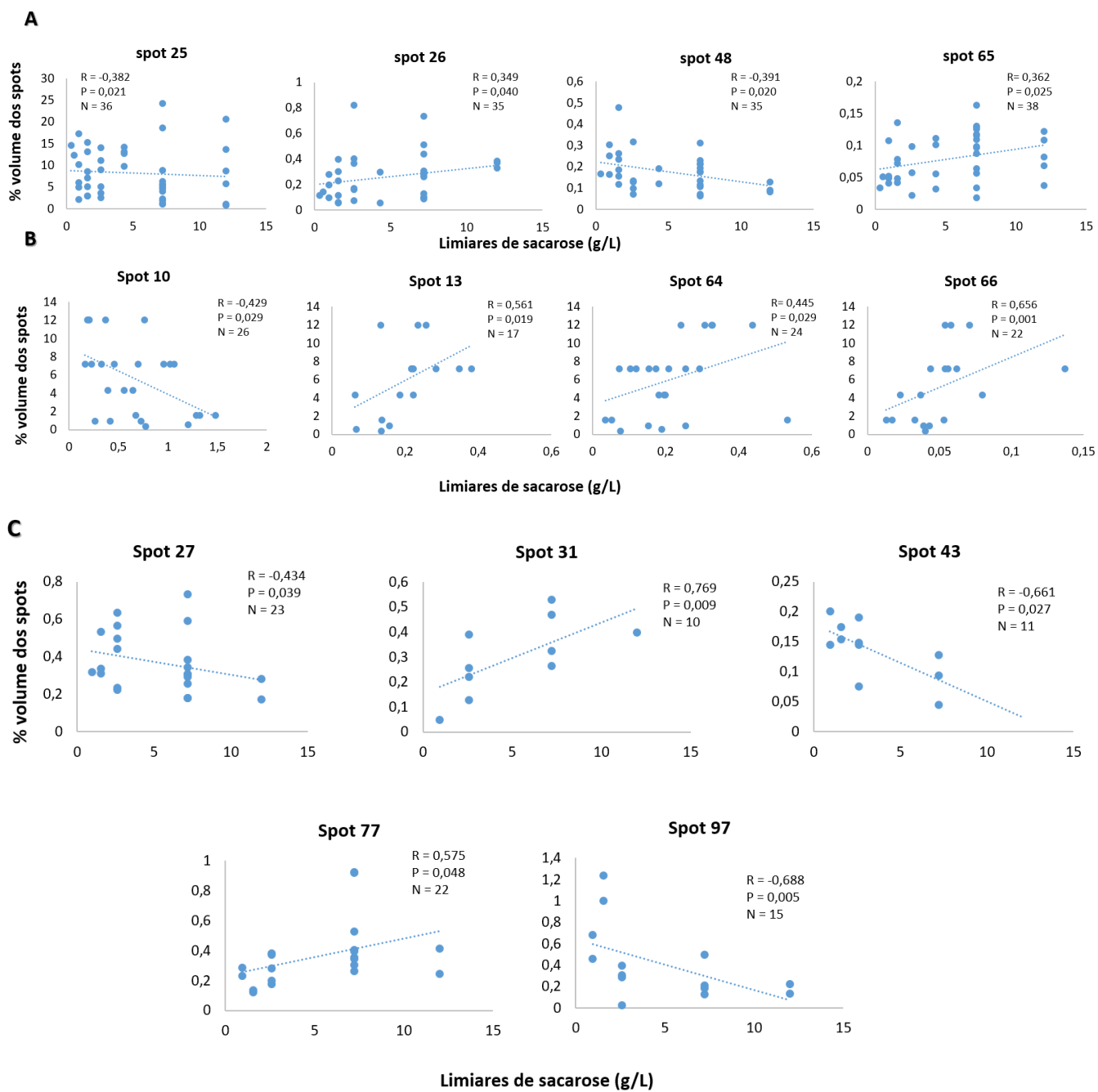


Figura 5.6 - Gráficos da relação significativa entre a expressão proteica (% volume dos spots) e os limiares da sacarose (g/L) no total de indivíduos (A), em homens (B) e mulheres (C). Diferenças são significativas para $P < 0,05$.

5.3.6. Previsão de modificações pós-traducionais (PTMs)

A observação de diferenças entre as massas moleculares teórica e estimada e entre pI teórico e estimado, para alguns *spots* cuja identificação resulta na mesma proteína, sugere que podem existir PTMs. Glicosilações e fosforilações são as duas PTMs mais comuns e são as principais responsáveis pelas maiores alterações observadas na massa molecular e pI de proteínas observadas em perfis bidimensionais. Devido a tal, foram utilizadas as aplicações FindMod, GlycoMod e NetPhos 2.0 para prever a presença de PTMs em proteínas identificadas por MS.

Foi efetuada a pesquisa de PTMs em 10 *spots* diferencialmente expressos entre grupos de sensibilidade para o doce, os quais correspondem às proteínas região C da cadeia K de imunoglobulina (*spots* 27 e 55), CA-VI (*spots* 64 e 65), proteína induzida por prolactina (*spot* 31) e α -amilase salivar (*spots* 77, 78 e 120). Em todos os *spots* foi observada a possibilidade de existirem glicosilações, ou seja, resíduos glucídicos associados à proteína, sendo os mais comuns oligossacarídeos ligados através do grupo hidroxilo de serina ou treonina (O-glyc), embora também se tenham observado oligossacarídeos ligados através do grupo amida de um resíduo de aspargina (N-glyc.). Todos os *spots* analisados apresentaram fosforilações, ou seja, observou-se a adição de um grupo fosfato nos aminoácidos serina, tirosinas ou treonina (Anexo V- tabela 1 suplementar).

5.4. Discussão

O objetivo deste capítulo consiste na análise da relação entre a composição proteica da saliva e a sensibilidade para o gosto doce. Até agora, a maioria dos estudos abordaram principalmente o envolvimento das proteínas salivares na percepção do gosto amargo. Que seja do nosso conhecimento, este é o primeiro estudo que avalia a relação entre o proteoma da saliva e a sensibilidade gustativa para o doce.

A amostra em estudo é constituída por homens e mulheres, dos quais cerca de 77,9% são normoponderais e 22,1% com excesso de peso. Ainda que não tenham sido observadas diferenças de sensibilidade para o doce entre indivíduos normoponderais e com excesso de peso, no que diz respeito aos dois sexos (e principalmente ao considerar apenas os indivíduos normoponderais), observou-se uma tendência para maior sensibilidade ao gosto doce por parte das mulheres: tendência para média de limiares de detecção de sacarose inferiores aos dos homens e tendência para maior percentagem de mulheres sensíveis do que de homens sensíveis a este gosto.

As diferenças na percepção gustativa entre sexos para os diferentes gostos básicos, têm sido avaliadas em alguns estudos. Embora alguns autores não tenham observado diferenças (Stevens *et al.*, 1991), outros observaram uma diminuição na sensibilidade em homens adultos, comparativamente a mulheres, para os compostos PROP e quinino (Glanville *et al.*, 1964), HCl e ácido cítrico (Mojet *et al.*, 2001) e KCl e sacrose (Mojet *et al.*, 2003).

Os perfis proteicos eletroforéticos mostraram a existência de relação entre proteoma salivar e sensibilidade para o gosto doce. No caso das proteínas separadas apenas de acordo com a sua massa molecular (perfis SDS-PAGE), observaram-se diferenças significativas nos níveis de expressão de 4 bandas proteicas, duas delas em mulheres e duas diferentes em homens. No que diz respeito aos perfis proteicos bidimensionais, observaram-se 23 *spots* diferencialmente expressos entre grupos de sensibilidade para o doce, sendo que destes, oito apresentaram diferenças significativas apenas em homens e dez apenas em mulheres.

A proteína amilase salivar, uma das proteínas mais abundantes na saliva, além de desempenhar funções antibacterianas, lubrificação e proteção (Humphrey *et al.*, 2001), tem como principal função a clivagem de ligações glicosídicas de hidratos de carbono complexos, iniciando assim a digestão do amido na boca, da qual resulta maltose, triose e outros oligossacáridos como produtos dessa digestão (Harris *et al.*,

1998). Este processo poderá ter efeito na percepção gustativa uma vez que a α -amilase influencia a percepção da textura (viscosidade) de alimentos ricos em amido na cavidade oral (Mandel *et al.*, 2010), tendo sido sugerida a possibilidade de influência direta a nível do gosto (Santos *et al.*, 2012). Isto porque a digestão do amido, por esta proteína, resulta num aumento dos níveis de moléculas doces, como maltose e, posteriormente, glucose na cavidade oral (Santos *et al.*, 2012). No presente estudo, foram observadas diferenças no nível de expressão desta proteína entre indivíduos sensíveis e pouco sensíveis ao gosto doce. Embora não tenham sido observadas diferenças estatisticamente significativas na atividade enzimática por volume de saliva (U/L), observou-se uma atividade enzimática por minuto (U/min) significativamente mais elevada em homens com baixa sensibilidade para o gosto doce. A atividade por minuto tem em consideração a taxa de fluxo salivar, podendo refletir melhor o que acontece na boca por unidade de tempo. Para além disso, os resultados obtidos pela análise dos perfis proteicos unidimensionais, também indicaram níveis de expressão desta proteína aumentados em homens pouco sensíveis. Tendo em conta os perfis bidimensionais, também se observaram diferenças significativas nos níveis de expressão de diferentes *spots* identificados como α -amilase, também no sentido de maiores níveis de expressão nos indivíduos pouco sensíveis, mas aqui tanto em homens como em mulheres. O facto de nos perfis bidimensionais, ao contrário do que se verificou nos unidimensionais, terem sido observadas diferenças em ambos os sexos, pode estar relacionado a técnica de separação proteica utilizada, visto que com eletroforese 2D, consegue-se uma maior individualização das proteínas, pois para além da separação de acordo com as massas moleculares se consegue uma separação de acordo com a carga das proteínas.

Uma hipótese para explicar níveis mais elevados da enzima α -amilase em indivíduos pouco sensíveis é a de que a percepção do doce pode depender da concentração de açúcares que estimulam continuamente os recetores gustativos, e níveis de amilase mais elevados, levam a uma presença mais elevada de moléculas doces na boca. Alterações da sensibilidade em resultado da dessensibilização dos recetores, foi reportado anteriormente (Matsuo, 2000). Além disso, a combinação dos resultados deste estudo com estudos de outros autores, suportam a ideia de que uma baixa percepção gustativa ao doce poderá estar associada a níveis elevados de amilase salivar: por um lado, há estudos que referem que indivíduos obesos têm níveis de preferência por doce mais elevados que poderá estar associado a menor sensibilidade para este gosto (Bartoshuk *et al.*, 2006); por outro lado, indivíduos obesos [quer ratos (Rodrigues *et al.*, 2015), quer humanos (Lamy *et al.*, 2015)] apresentaram níveis de expressão desta proteína mais elevados.

Foi também observada uma relação entre os níveis de glucose salivar e a sensibilidade para o gosto doce, nos indivíduos avaliados. Esta relação foi evidente apenas em mulheres, tendo sido observada uma mais elevada concentração de glucose na saliva de mulheres pouco sensíveis ao doce, comparativamente às mulheres sensíveis a este gosto. Tal como foi referido anteriormente, níveis mais elevados de glucose na saliva podem significar uma estimulação contínua dos recetores gustativos, sendo necessário uma concentração de estímulo doce mais elevada para que haja percepção do gosto.

Os *spots* identificados como proteína secretora rica em cisteína 3, região C da cadeia K de imunoglobulinas e proteína induzida pela prolactina (PIP), são *spots* que, apesar de estarem relacionados com a sensibilidade para o doce em ambos os sexos, a sua relação é oposta em homens e mulheres. Com efeito, as proteínas identificadas como região C da imunoglobulina K e proteína secretora rica em cisteína 3 apresentaram uma expressão mais elevada em homens pouco sensíveis e em mulheres sensíveis, comparativamente aos pares sensíveis e pouco sensíveis, respetivamente. A proteína secretora rica em cisteína foi originalmente descrita como uma proteína dependente de androgénios nas glândulas salivares de murganhos (Haendler *et al.*, 1993). Que seja do nosso conhecimento não há estudos que demonstrem uma relação entre níveis de androgénios e percepção de gosto doce. No entanto, Curtis e colaboradores observaram um possível efeito dos estrogénios na mediação de respostas gustativas a concentrações específicas de sacarose (Curtis *et al.*, 2004) e na deteção de limiares de sacarose, em ratos (Curtis *et al.*, 2005). Além disso, observou-se também que o estado hormonal contribui para variações no gosto em mulheres: há evidências de que a capacidade de provar o amargo é influenciada por hormonas em mulheres em idade fértil, estando essa capacidade aumenta no início da gravidez e diminuída após a menopausa (Prutkin *et al.*, 2000). Dada esta relação entre os níveis de proteína secretora rica em cisteína e níveis de hormonas sexuais, uma diferente relação entre os níveis de expressão desta proteína e a sensibilidade gustativa, entre os dois sexos não é completamente inesperada.

No que diz respeito à cadeia K de imunoglobulina (cadeia leve de imunoglobulinas), foram observados maiores níveis de expressão em indivíduos com maiores níveis de percepção para o amargo (Dsamou *et al.*, 2012 e capítulo 4 da presente tese). Quer as IgG, quer as IgA estão tipicamente presentes na saliva humana (Humphrey *et al.*, 2001; Lima *et al.*, 2010). A cadeia leve, identificada nos *spots* referidos, pode pertencer a qualquer um destas isoformas de imunoglobulinas, pelo que o motivo pelo qual a sua diferente relação com a percepção do gosto doce, em homens e mulheres é difícil de explicar com os dados existentes. Por outro lado, os níveis de

imunoglobulinas presentes na saliva são afetados pelo estado imunológico dos indivíduos (Lima *et al.*, 2010). Ainda que aparentemente, os indivíduos testados no presente trabalho tenham declarado ser saudáveis e não apresentassem sinais evidentes de doença, não conseguimos garantir que os mesmos estivessem livres de qualquer tipo de infecção/inflamação que afetasse os níveis de imunoglobulinas salivares.

No caso do *spot* identificado como PIP, os níveis de expressão, em homens, estão aumentados no grupo de indivíduos sensíveis, enquanto nas mulheres o aumento observou-se no grupo de pouco sensíveis. Esta proteína foi já relacionada com a sensibilidade para o gosto amargo, no capítulo 4 e em estudos de outros autores (Morzel *et al.*, 2014; Dsamou *et al.*, 2012). O motivo pelo qual esta proteína apresenta uma relação diferente com o gosto doce em homens e mulheres, necessita de estudos futuros para ser elucidada, no entanto existem referências acerca da influência hormonal na expressão desta proteína, sendo a mesma regulada positivamente por androgénios e glucocorticoides, e negativamente por estrogénios (Hassan *et al.*, 2009).

As proteínas salivares CA-VI e cistatinas foram observadas como estando diferencialmente expressas entre grupos de sensibilidade para o doce, sendo que a proteína CA-VI apresentou uma expressão mais elevada em indivíduos pouco sensíveis e a proteína cistatina uma expressão mais elevada em indivíduos sensíveis a este gosto. Embora a sua função completa permaneça ainda por elucidar, a proteína CA-VI salivar tem sido reportada como um fator trófico no crescimento e desenvolvimento dos gomos gustativos (Henkin *et al.*, 1999), sendo que carências nesta proteína foram associadas com uma perceção gustativa diminuída (Shatzman & Henkin, 1981).

Por outro lado, a proteína cistatina salivar é um inibidor de proteases de cisteína e participa no controlo da proteólise no interior da cavidade oral. Uma expressão elevada desta proteína na saliva foi sugerida como estando relacionada com baixos níveis de proteólise, a qual pode afetar a película mucosa que reveste a cavidade oral, reduzindo a acessibilidade das moléculas do gosto para os respetivos recetores (Dsamou *et al.*, 2012). Apesar destas proteínas serem observadas como estando diferencialmente expressas entre grupos de sensibilidade para o doce, ambas têm sido relacionadas com a aceitação para o gosto amargo em estudos realizados por outros autores (Morzel *et al.*, 2014; Dsamou *et al.*, 2012; Patrikainen *et al.*, 2014). Além disso, a bibliografia não faz referência ao papel destas proteínas na perceção do gosto doce, sendo necessária uma investigação mais profunda para ajudar a explicar estes resultados. No entanto, apesar destas proteínas estarem apenas relacionadas com o gosto amargo em estudos

anteriores, não significa que as mesmas não possam estar igualmente relacionadas com o gosto doce. Apesar de não existir uma explicação científica que ajude a compreender o papel das mesmas na percepção do doce, em parte devido à falta de estudos que relacionem o perfil proteico salivar com este gosto, e de ser necessária uma investigação mais profunda para ajudar a explicar estes resultados, é expectável o papel das mesmas na percepção do gosto doce, tal como acontece no amargo, uma vez que ambos os gostos apresentam um mecanismo de transdução de sinal semelhante (Margolskee, 2002).

Observou-se que as proteínas identificadas em diferentes *spots* apresentaram variação no *pI* e massa molecular, podendo essa variação ser resultado de modificações pós-traducionais, como glicosilação, fosforilação ou processamento proteolítico (Hardt *et al.*, 2005). Glicanos covalentemente ligados a proteínas podem influenciar as suas propriedades físico-químicas, desempenhando papéis importantes em diversos processos biológicos, tais como no desenvolvimento embrionário, reconhecimento hormonal e interações célula-célula. Além disso, a presença de hidratos de carbono ligados a proteínas pode alterar a sua solubilidade, flexibilidade, estabilidade e capacidade de agregação (Temporini *et al.*, 2008). Neste estudo observou-se que as glicosilações mais comuns são as O-glicosilações, nas quais os açúcares se encontram ligados a resíduos de serina ou treonina.

A ligação covalente de um grupo fosfato a resíduos de serina, treonina ou tirosina é um processo dinâmico e reversível que regula diversas funções da proteína, tais como divisão celular, crescimento e diferenciação. Neste trabalho, observou-se que as fosforilações ocorrem em resíduos de serina, treonina e tirosina, sendo que uma proteína pode apresentar vários sítios de fosforilação, tal como descrito em estudos anteriores (Temporini *et al.*, 2008).

Tal como em estudos anteriores (Hirtz *et al.*, 2005), também aqui a proteína amilase salivar é a que apresenta mais *spots* com variação na massa molecular e ponto isoelétrico. No organismo humano, existem cinco isoenzimas de amilase: três isoformas de amilase salivar (família A) e duas isoformas de amilase pancreática (família B). A diferença entre as isoformas reside no conteúdo em carboidratos, visto que a família de isoenzimas de amilase salivar apresentam carboidratos na sua constituição, ao contrário da família de isoenzimas de amilase pancreática (Keller *et al.*, 1971). A técnica de eletroforese bidimensional acoplada a espectrometria de massa, ao contrário do SDS-PAGE unidimensional, permite a separação e identificação destas isoformas. Nos resultados apresentados neste capítulo, foram identificados 3 *spots* de amilase, diferencialmente expressos entre mulheres com diferente sensibilidade, e um

diferencialmente expresso entre homens com diferente sensibilidade. Estes *spots* correspondem a diferentes isoformas ou fragmentos da enzima α -amilase. Estas isoformas, com MW compreendida entre 43,6-59,4 kDa e *pI* entre 5,6-6 apresentaram uma expressão significativamente mais elevada em indivíduos pouco sensíveis, comparativamente a sensíveis.

Além do papel desempenhado pela proteína α -amilase, pouco se sabe acerca da influência das restantes proteínas salivares na percepção do gosto doce. A falta de resultados e estudos relacionados com este gosto reforça a relevância deste trabalho e a necessidade da realização de novos, de modo a compreender o papel de algumas proteínas salivares, que se pensava estarem apenas relacionadas com o gosto amargo, na percepção do gosto doce.

5.5. Conclusão

Apesar de, nos últimos anos, terem surgido estudos que relacionam o proteoma salivar com a percepção oral, os mesmos encontram-se focados na adstringência e no gosto amargo. Tal deve-se ao fato de, frequentemente, ser aceite que a resposta aos compostos PROP e PTC reflete a sensibilidade para diferentes sensações orais. No entanto, os resultados apresentados no presente capítulo mostram que a composição da saliva está também relacionada com a sensibilidade para o doce.

Os níveis de glucose salivar foram observados como estando aumentados em indivíduos com menor sensibilidade gustativa, mas apenas no caso das mulheres. O porquê disso não se observar em homens fica por elucidar neste trabalho, sendo para isso necessários estudos futuros. No entanto, olhando simultaneamente para este resultado e para as características das proteínas que apresentaram diferentes níveis de expressão entre indivíduos com diferentes sensibilidades para o gosto doce, podemos sugerir um papel destas últimas na receção/deteção do gosto desencadeado pela glucose. No caso dos homens, há níveis mais elevados de proteínas com *pI* próximo do pH da saliva em indivíduos pouco sensíveis do que em indivíduos sensíveis. Essas proteínas com *pI* mais próximo do pH da saliva estarão assim mais próximas do seu ponto isoelétrico, e de precipitar/complexar com uma molécula como a glucose, impedindo-a de aceder aos locais de receção do gosto. No entanto, e como foi referido, esta é apenas uma hipótese necessita ser confirmada em trabalhos futuros.

Que seja do nosso conhecimento, este é o primeiro estudo em que o proteoma salivar é comparado entre indivíduos com diferentes níveis de sensibilidade para o gosto

doce. Estes primeiros resultados suportam a hipótese de uma relação entre saliva e percepção para o gosto doce, a qual merecerá um estudo mais aprofundado, de modo a compreender os mecanismos de ação deste fluído ao nível desta percepção.

Capítulo 6

Influência da sensibilidade gustativa nas preferências alimentares e IMC em crianças

6.1. Introdução

As escolhas alimentares têm um papel determinante no bem-estar e na saúde dos indivíduos, o que torna essencial a compreensão dos fatores que as determinam. Por exemplo, a ingestão de alimentos com elevado teor calórico, ricos em açúcares, sal e gordura, associada a um baixo consumo de vegetais e frutos contribui para o desenvolvimento de diversas patologias como diabetes, hipertensão, ou diversos tipos de cancro (Who & Consultation, 2003). Um padrão alimentar desta natureza está cada vez mais implantado nos países desenvolvidos e em vias de desenvolvimento, estando grandemente associado a aumentos na taxa de prevalência de obesidade, quer em adultos (Popkin & Gordon-Larsen, 2004) quer em crianças (Janssen *et al.*, 2005). O caso da obesidade infantil tem particular interesse porque vários estudos mostram que indivíduos que foram obesos em pelo menos uma parte da sua infância, têm maior probabilidade de serem adultos obesos, com as co-morbilidades associadas (Freedman *et al.*, 2002). No caso de Portugal, a questão da obesidade infantil ainda assume uma maior relevância e preocupação, pois este é um dos países da Europa com maiores taxas de crianças com excesso de peso e obesidade (World Health Organization, 2013).

A compreensão dos fatores que influenciam e determinam as preferências e escolhas alimentares tem sido objeto de diversos estudos com crianças. Além dos aspetos fisiológicos e biológicos, as escolhas alimentares são também determinadas por fatores sociais (Hetherington *et al.*, 2006), económicos (Drewnowski & Specter, 2004) e culturais (Kumanyika, 2008).

De entre os diversos fatores que influenciam as preferências, a palatabilidade dos alimentos é um dos mais relevantes. A palatabilidade, associada ao valor hedónico (prazer) dos alimentos, sendo definida, por um lado, pelas características intrínsecas ao alimento e, por outro, pelas características do próprio indivíduo (fatores homeostáticos) (Friedman & Stricker, 1976), tem como origem do nome a palavra “palato”, precisamente pela sua grande dependência da perceção oral. Apesar da grande influência da palatabilidade no comportamento de ingestão, a literatura apresenta controvérsia relativamente ao modo como a perceção oral e, mais concretamente a sensibilidade para os gostos básicos influencia as preferências alimentares.

De entre os 5 gostos básicos (doce, amargo, ácido, salgado e umami), o doce e o amargo têm a particularidade de apresentar mecanismos comuns na forma como o sinal é recebido e traduzido (ambos os recetores estão acoplados a uma proteína G e

as vias de sinalização convergem em elementos comuns que conduzem ao aumento de Ca^{2+} no interior da célula, seguido de libertação de neurotransmissores) (Margolskee, 2002). No entanto, estes gostos provocam reações inatas opostas: o doce está associado à aceitação/prazer (Swithers *et al.*, 2010) e o amargo à rejeição/aversão (Glendinning, 1994). É de esperar, portanto, que a perceção destes dois gostos influencie as preferências e os hábitos alimentares e, possivelmente, o desenvolvimento de obesidade.

A aceitação e o consumo de vegetais e frutas têm sido associados a diferenças na sensibilidade para o gosto amargo do composto PROP. Estudos realizados com adultos (Drewnowski *et al.*, 1999; Dinehart *et al.*, 2006; Sandell *et al.*, 2014) e com crianças (Keller *et al.*, 2002; Turnbull and Matisoo-Smith, 2002; Bell and Tepper, 2006) reportaram uma menor aceitação e consumo de vegetais amargos, como brócolos, couve de Bruxelas, repolho, couve, espargos e espinafres, por parte de adultos e crianças sensíveis ao PROP (*Tasters*). Para além dos vegetais, a sensibilidade ao composto amargo PROP foi ainda associada a uma diminuição da preferência por frutas e alimentos picantes (Monneuse *et al.*, 2008). Outros estudos não observaram diferenças significativas no consumo de alimentos entre sensíveis e não sensíveis ao PROP, nem em adultos (Martínez-Ruiz, 2014) nem em crianças (O'Brien *et al.*, 2013), sugerindo que a dieta não é influenciada pela perceção do gosto amargo. Para além dos estudos referidos, o índice de massa corporal (IMC) também é sugerido como estando relacionado com a sensibilidade gustativa e/ou preferências. Diversos autores confirmaram que indivíduos obesos apresentam alterações na perceção do gosto doce, sugerido que os mesmos percebem este gosto como sendo menos intenso que o normal e demonstraram preferência pelo mesmo (Bartoshuk *et al.*, 2006).

Tal como foi referido no início da introdução, as escolhas alimentares dependem de diversos fatores, pelo que, para a compreensão das preferências e alterações na composição corporal (incluindo desenvolvimento de obesidade) para além da perceção sensorial é importante considerar parâmetros tais como os hábitos e estilos de vida (Booth *et al.*, 2001). Um estudo europeu demonstrou que crianças com maior exposição à televisão consomem mais alimentos ricos em açúcar e gordura (Lissner *et al.*, 2012). Outros estudos reportaram que os pais influenciam as escolhas alimentares das crianças, visto que determinam a disponibilidade de certos alimentos e impõem regras no consumo dos mesmos. Para além disso, podem mesmo modular as preferências alimentares: por exemplo, Birch (1999) demonstrou que as crianças desenvolveram preferência por alimentos que foram utilizados como recompensa por parte dos pais.

O objetivo deste estudo consistiu em avaliar a existência de relação entre a sensibilidade para os gostos doce e amargo e as preferências por diferentes alimentos, em crianças de 8-9 anos de idade. Tendo em conta que a obesidade infantil está associada a diversos fatores, para além dos hábitos alimentares, parâmetros socioeconómicos, hábitos de prática de atividade física e hábitos associados à alimentação, foram também avaliados, bem como a sua possível associação com as preferências alimentares.

6.2. Materiais e métodos

6.2.1. Indivíduos em estudo

Trezentas e oitenta e sete crianças caucasianas (199 rapazes e 188 raparigas), com idades compreendidas entre 8-9 anos, aparentemente saudáveis, participaram voluntariamente no estudo que compreende avaliações antropométricas, a realização de testes de sensibilidade gustativa e recolha de saliva. Com efeito, as recolhas e os testes de sensibilidade efetuaram-se ao longo de um período de 1 mês, em turmas do 3ºano de 21 escolas do 1º ciclo do ensino básico, do Concelho de Évora. As recolhas de dados foram realizadas no período da manhã, num período de, pelo menos 1h30min posterior à ingestão de alimentos ou bebidas (exceto água).

O encarregado de educação de cada criança foi informado previamente sobre o procedimento aplicado e o objetivo do estudo, tendo assinado um consentimento para a realização do mesmo (anexo VI). O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética da Universidade de Évora.

6.2.2. Estímulo gustativo, procedimento sensorial e avaliação das preferências alimentares em crianças

A metodologia para avaliação das sensibilidades para os gostos doce e amargo foi baseada num estudo europeu (IDEFICS *study*, 2006-2012), no qual foi avaliado a relação entre as preferências alimentares, dieta e excesso de peso em mais de 16000 crianças de 8 países europeus.

Para a avaliação das sensibilidades para os gostos doce e amargo foram realizados testes para determinação dos limiares de deteção. Foram utilizadas 5 concentrações diferentes de sacarose (3, 4, 8, 12 e 16mg/mL) e 5 concentrações

diferentes de cafeína (0,15, 0,20, 0,25, 0,3 e 0,4mg/mL), de acordo com Knof *et al.*(2011), apresentadas em códigos expressos com símbolos. As soluções foram preparadas com água destilada, tendo-se utilizado o mesmo tipo de água para as crianças beberem entre cada duas soluções. Foi pedido a cada criança que provasse cada uma das soluções e a comparasse com água, referindo quais as soluções que eram percebidas como água ou como algo diferente. O teste decorreu na forma de jogo, de modo semelhante ao descrito em Knof *et al.*(2011), onde era pedido a cada criança que assumisse o papel de detetive e “encontrasse os agentes infiltrados”, ou seja, as soluções diferentes de água, e que as colocassem no tabuleiro correspondente (anexo VII).

A concentração mais baixa, a partir da qual todas as outras foram percebidas como contendo uma solução diferente da água, foi considerada como o limiar de deteção dessa criança. As crianças foram classificadas como sensíveis, para o gosto respetivo, quando o seu limiar de deteção era inferior à mediana das diferentes concentrações usadas para cada gosto, à semelhança do critério adotado num estudo com diferentes países europeus (Ahrens, 2015). Crianças com limiares inferiores a 0,3 e 8mg/mL foram considerados sensíveis (SS) ao amargo e ao doce, respetivamente, sendo as restantes consideradas como pouco sensíveis (PS). Para crianças que não detetaram nenhuma das concentrações de sacarose, considerou-se o limiar de 20mg/mL. De modo semelhante, para crianças que não detetaram nenhuma concentração de cafeína, considerou-se o limiar de 0,8mg/mL.

De forma a avaliar os estilos de vida e preferências alimentares, foi aplicado um questionário (anexo VIII), dividido em três partes. A primeira parte consistiu na identificação da criança, com questões cerca da profissão e nível de escolaridade da mãe, pai ou encarregado de educação (para definição da posição social). A segunda parte do questionário compreendeu questões acerca dos estilos de vida: 1) frequência com que as crianças veem televisão; frequência com que jogam computador; frequência com que jogam consola; frequência com que leem livros (variáveis associadas a baixa atividade física); 2) frequência com que brincam/jogam na rua; frequência com que andam a pé em passeio (variáveis associadas a prática de atividade física não programada); toma de pequeno-almoço em casa; fazer as refeições principais com a família; comer alimentos diferentes do resto da família, às refeições; consumir doces e/ou refrigerantes nos intervalos das refeições; ver TV durante as refeições (variáveis associadas aos hábitos alimentares). Cada uma destas variáveis foi tratada a dois níveis: 1 – nunca ou poucas vezes; 2 – muitas vezes ou sempre.

Por fim, a terceira parte do questionário consistiu em questões acerca das preferências por diversos alimentos associados aos gostos doce e/ou amargo. O questionário é composto por 36 itens alimentares, agrupados em 7 grupos (vegetais amargos, vegetais doces, produtos lácteos, frutas ácidas, frutas doces, cereais e doces). Coca-cola, *ice-tea*, chocolate e batatas fritas não foram incluídos em nenhum dos grupos devido às suas propriedades particulares. As respostas consistiam, maioritariamente, em assinalar de 1 a 4, onde 1 representa nunca ou detesta, 2 representa não gosta, 3 representa gosta e o 4 representa sempre ou adora. Os questionários foram respondidos pelas próprias crianças, com o acompanhamento de um adulto (professor ou membro da equipa de investigação). As preferências alimentares foram analisadas tendo em conta os alimentos individualmente e considerando grupos, constituídos com base nas propriedades sensoriais geralmente associadas a esses alimentos. Os alimentos constituintes de cada grupo encontram-se listados na tabela 6.1.

Tabela 6.1- Grupos e respetivos alimentos

Frutas ácidas	Morangos
	Laranjas
	Kiwis
Frutas doce	Melo
	Melancia
	Banana
	Uvas
Cereais	Arroz
	Batata cozida
	Massas
	Pão
	Cereais de pequeno-almoço
Vegetais amargos	Espinafre
	Couve
	Couve de bruxelas
	Nabiças
	Espargos
	Agrião
	Pepino
Vegetais doces	Cenoura cozida
	Cenoura crua
	Couve-flor
	Ervilhas
Doces	Gomas

	Bolachas e bolos
Lácteos	logurte de aromas
	Leite simples
	Leite com chocolate

O percentil de Índice de Massa Corporal (%IMC) foi determinado através da medição do peso, em balança eletrónica (com possibilidade de obter valores aproximados aos 100g), e medição da estatura, através de estadiómetro [segundo o Plano de Frankfort (Lohman *et al.*, 1988)]. Esta avaliação foi efetuada por 2 examinadores especificamente formados para este fim. As crianças foram classificadas em quatro categorias: abaixo do peso normal (%IMC < 5), normoponderais (5 «%IMC < 85), pré-obesas (85 «%IMC < 95) e obesas (%IMC « 95) (segundo a Direção Geral de Saúde, 2006).

Para avaliação da posição social (PS) utilizou-se como critério a profissão da mãe, com base na classificação de Formosinho (1987). Quando mãe e pai apresentaram PS diferente considerou-se a da mãe. No que diz respeito à classificação relativa ao nível de escolaridade, a mesma foi feita com base na Classificação Internacional Tipo da Educação, UNESCO (2006).

6.2.3. Análise estatística

Para avaliar diferenças entre sexos e %IMC em termos de proporção de indivíduos pertencentes a cada grupo de perceção gustativa, foi efetuado o teste do Qui-quadrado.

Foram avaliados diferentes parâmetros relacionados com os estilos de vida (referidos na secção dos materiais e métodos). Para avaliar a existência de relação entre cada uma destas variáveis e a obesidade infantil foram feitos dois tipos de testes. Por um lado, os dois níveis de cada variável foram comparados entre si para avaliar a existência de diferenças nos percentis de IMC. As comparações foram feitas através do teste não paramétrico de Mann-Whitney. Por outro lado, para cada uma das variáveis referidas, os grupos de percentil de IMC (normoponderais, pré-obesos e obesos) foram comparados em termos de percentagem de crianças pertencente a cada nível de frequência, através do teste do Qui-quadrado (tabelas de contingência). A frequência associada a cada um destes diferentes parâmetros ligados aos estilos de vida foi comparada entre crianças que “gostam” e crianças que “não gostam” de cada um dos alimentos avaliados, através do teste do Qui-quadrado (tabelas de contingência), de

modo a avaliar a existência de relação entre estes parâmetros e as preferências alimentares.

O coeficiente tau de Kendall foi utilizado para avaliar a existência de correlação entre as variáveis posição social, nível de escolaridade, frequência de prática de atividade física programada e grupo de percentil de IMC.

Toda a análise estatística foi realizada com recurso ao software SPSS versão 22,0 (SPSS Inc., Chicago, USA). As diferenças foram consideradas para um intervalo de confiança de 95%.

6.3. Resultados

6.3.1. Características das crianças que participaram no estudo

As características das crianças que participaram neste estudo encontram-se resumidas na Tabela 6.2. Algumas crianças não completaram os testes de avaliação sensorial e/ou não tiveram respostas coerentes de modo a poder classifica-las de acordo com a sua sensibilidade gustativa. Nesses casos, as mesmas não foram consideradas para análise. Houve ainda algumas crianças que não perceberam e/ou não souberam responder a algumas perguntas dos questionários. Isto resultou num N um pouco diferente entre alguns dos parâmetros, como está descrito na Tabela 6.2.

Uma percentagem considerável de crianças (mais de 35%) apresentou excesso de peso (pré-obesidade ou obesidade), sendo semelhantes as percentagens de crianças pertencentes a cada grupo de %IMC, em rapazes e raparigas.

Tabela 6.2 – Características das crianças em estudos

Parâmetro	Crianças avaliadas (N=387)	
Sexo		
Rapazes [% (n)]	51,4 (199)	
Raparigas [% (n)]	48,6 (188)	
IMC (percentil) (media ± dp)	63,55 ± 30,18	
Grupo de percentil de IMC [% (n)]	Rapazes	Raparigas
<i>Normoponderais</i>	66,5 (133)	63,3 (119)

<i>Pré-obesos</i>	19,8 (39)	21,8 (41)
<i>Obesos</i>	13,7 (27)	14,9 (28)
Posição social (PS) [% (n)]^a		
<i>Estrato operário e rural (trabalhadores manuais)</i>	44,4 (156)	
<i>Classe média menos instruída</i>	17,4 (61)	
<i>Classe média mais instruída</i>	34,8 (122)	
<i>Classe superior</i>	3,4 (12)	
Nível de escolaridade [% (n)]^b	Mãe	Pai
<i>4º ano ou 6º ano de escolaridade (ou equivalente)</i>	11,1 (36)	18,0 (53)
<i>9º ano de escolaridade (ou equivalente)</i>	15,2 (49)	19,0 (56)
<i>Ensino secundário</i>	31,0 (100)	36,3 (107)
<i>Ensino pós-secundário não superior</i>	4,0 (13)	5,1 (15)
<i>Bacharelato, Licenciatura ou Mestrado</i>	36,8 (119)	19,7 (58)
<i>Doutoramento</i>	1,9 (6)	2,0 (6)
Crianças que completaram as tarefas (n)	Rapazes	Raparigas
Avaliação antropométrica	199	188
Avaliação de limiares de deteção de sacarose (doce)	190	176
Avaliação de limiares de deteção de cafeína (amargo)	178	166
Resposta a questões sobre PS e/ou nível de escolaridade	184	169
Resposta a questões sobre hábitos de atividade física	178	161
Resposta a questões sobre hábitos relacionados com alimentação	187	171
Avaliação das preferências gustativas	184	171

n – número de indivíduos analisados em cada grupo, a – classificação de acordo com a posição social é a de Formosinho *et al.* (1987); b – A classificação relativamente ao nível de escolaridade foi feita com base na CITE, UNESCO (2006).

6.3.2. Perceção gustativa das crianças e percentil IMC

Das 387 crianças em estudo, 344 foram classificadas consoante o gosto amargo e 366 consoante o gosto doce.

A distribuição das crianças pelos grupos de sensibilidade gustativa encontra-se representada na figura 6.1:

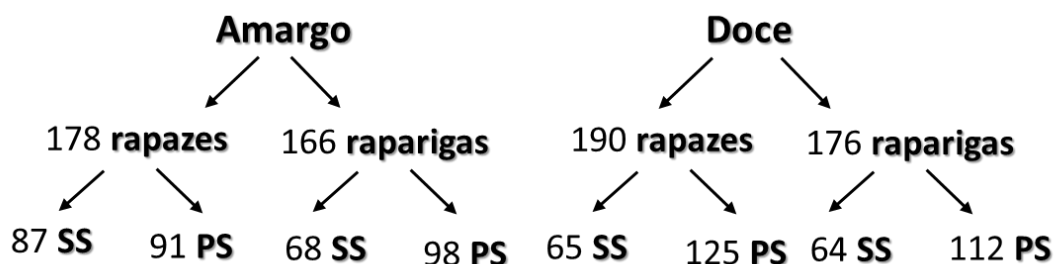


Figura 6.1- Distribuição das crianças (tendo o sexo em consideração) pelos grupos de sensibilidade para o gosto amargo e para o gosto doce. SS- sensíveis; PS- pouco sensíveis

Os limiares de deteção para o gosto amargo não se correlacionam com os limiares de deteção do gosto doce. Esta análise foi feita tendo em conta o total de indivíduos ($R=0,12$; $P=0,822$) e tendo em conta cada sexo individualmente ($R=0,061$; $P=0,424$ para rapazes; $R= -0,044$; $P=0,585$ para raparigas).

Através do teste do Qui-quadrado, observou-se que a proporção de sensíveis e pouco sensíveis para o gosto amargo é semelhante em rapazes e raparigas (sensíveis: 48,9% dos rapazes e 41,0% das raparigas; pouco sensíveis: 51,1% dos rapazes e 59% das raparigas; $P=0,141$). O mesmo se observou tendo em conta o gosto doce (sensíveis: 34,2% rapazes e 35,2% raparigas; pouco sensíveis: 65,8% rapazes e 64,8% raparigas; $P=0,667$) (tabela 6.3).

Tabela 6.3- Percentagem de crianças sensíveis e pouco sensíveis pertencentes a cada grupo de sensibilidade para os gostos amargo e doce.

		% indivíduos	
		Sensíveis	Pouco sensíveis
Grupos de sensibilidade gustativa para o amargo	Total crianças	45,1	54,9
	Rapazes	48,9	51,1
	Raparigas	41,0	59
Grupos de sensibilidade gustativa para o doce	Total crianças	35,2	64,8
	Rapazes	34,2	65,8
	Raparigas	35,2	64,8

Também os limiares de deteção da cafeína e da sacarose foram comparados entre sexos. Não foram observadas diferenças significativas entre rapazes e raparigas na média dos limiares de deteção da cafeína (rapazes: $0,35\pm 0,02$; raparigas: $0,37\pm 0,02$ mg/mL; $P=0,430$) nem na média dos limiares de deteção da sacarose (rapazes: $7,77\pm 0,29$; raparigas: $7,94\pm 0,33$ mg/mL; $P=0,711$).

No presente estudo não se observaram diferenças estatisticamente significativas, entre grupos de percentil de IMC, na proporção de crianças pertencentes a cada grupo de sensibilidade gustativa (Tabelas 6.4 e 6.5). No entanto, observou-se uma ligeira tendência para crianças obesas terem maior proporção de indivíduos sensíveis para o gosto amargo do que crianças normoponderais: através do teste de Fisher, ao comparar apenas os grupos extremos de percentil de IMC (normoponderais vs. obesos), obtém-se um valor de P de 0,133.

Tabela 6.4- Percentagem de crianças normoponderais, pré-obesas e obesas pertencentes a cada grupo de sensibilidade para o gosto amargo.

		Grupo de %IMC	% indivíduos			P (teste χ^2)
			normoponderais	Pré-obesos	Obesos	
Grupos de sensibilidade para o amargo	Total	Sensíveis	43,2	45,7	52,8	0,446
		Pouco sensíveis	56,8	54,3	47,2	
	Rapazes	Sensíveis	47,1	50	57,7	0,614
		Pouco sensíveis	52,9	50	42,3	
	Raparigas	Sensíveis	38,6	42,1	48,1	0,661
		Pouco sensíveis	61,4	57,9	51,9	

Tabela 6.5- Percentagem de crianças normoponderais, pré-obesas e obesas pertencentes a cada grupo de sensibilidade para o gosto doce.

		Grupo de %oIMC	% indivíduos			P (teste X ²)
			normoponderais	Pré-obesos	Obesos	
Grupos de sensibilidade para o doce	Total	Sensíveis	35,9	35,5	32,7	0,910
		Pouco sensíveis	64,1	64,5	67,3	
	Rapazes	Sensíveis	34,1	37,8	30,8	0,840
		Pouco sensíveis	65,9	62,2	69,2	
	Raparigas	Sensíveis	37,8	33,3	34,6	0,864
		Pouco sensíveis	62,2	66,7	65,4	

6.3.3. Estilos de vida e obesidade infantil

Neste trabalho observou-se uma forte correlação entre a posição social e o nível de escolaridade da mãe ($R=0,764$; $P=0,0005$) e moderada entre a posição social e o nível de escolaridade do pai ($R=0,541$; $P=0,0005$). No que diz respeito às características antropométricas, observou-se uma tendência para a média de percentis de IMC das crianças pertencentes à posição social mais baixa ser mais elevada do que nas posições sociais mais altas (Figura 6.2). Ainda que a diferença não seja estatisticamente significativa, para um intervalo de confiança de 95%, o valor de P é baixo ($P=0,050$), quando a comparação é feita entre a posição social mais baixa e as restantes posições sociais em conjunto.

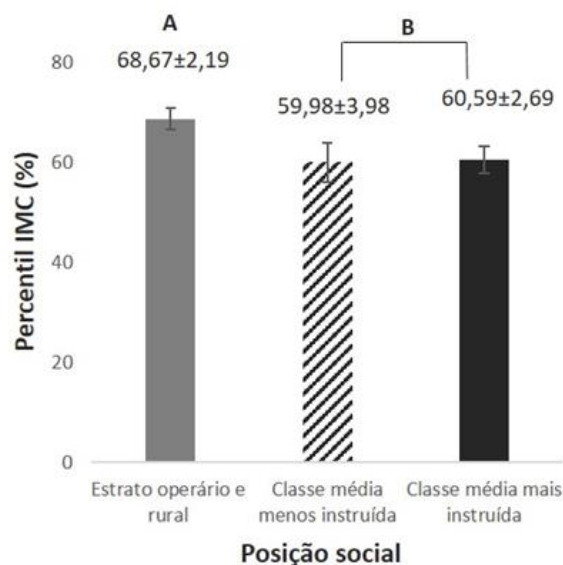


Figura 6.2 – Variações no percentil de IMC entre as diferentes posições sociais. Letras diferentes (A e B) representam tendência ($P=0,050$) para diferenças nos percentis entre as crianças pertencentes à posição social mais baixa e as crianças pertencentes às outras posições sociais (teste Mann-Whitney).

Também para o nível de escolaridade das mães se observaram diferenças nos percentis de IMC, tendo as crianças, que são filhas de mães com um nível de escolaridade igual ou superior a licenciatura, percentis de IMC mais baixos do que as restantes crianças ($59,6\pm 2,6$ vs. $66,6\pm 2,1$, respetivamente; $P=0,036$).

Ao avaliar a possível relação entre a prática de atividade física e as características antropométricas, através do teste de Kruskal-Wallis, observou-se que crianças que praticam atividade física três ou mais vezes por semana, apresentaram médias de percentis de IMC mais elevados, comparativamente às que praticam menos vezes, ou mesmo às que não praticam ($70,43\pm 3,58$, $62,10\pm 2,75$ e $61,43\pm 2,41$, respetivamente; $P=0,038$).

Também se observaram correlações positivas significativas entre a frequência de atividade física programada e a posição social ($R=0,191$; $P=0,0005$; Tau de Kendal) e entre a atividade física programada e o nível de escolaridade da mãe ($R=0,195$; $P=0,0005$; Tau de Kendal). Ainda que estas sejam correlações fracas, ao comparar os três níveis de escolaridade considerados, observaram-se diferenças significativas no que diz respeito ao número médio de atividades praticadas por semana ($1,20\pm 0,72$, $1,24\pm 0,44$ e $1,98\pm 0,155$, para níveis de escolaridade inferiores ao 9º ano, 12º ano completo e frequência universitária ou superior, respetivamente; $P=0,0005$) (Figura 6.3).

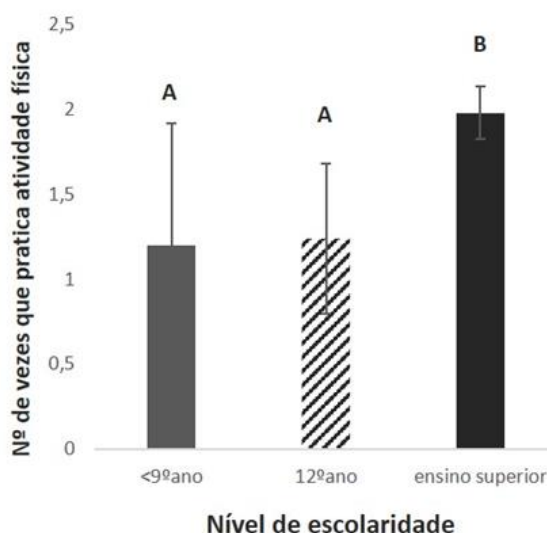


Figura 6.3 – Variações na frequência de atividade física programada entre diferentes níveis de escolaridade das mães. Letras diferentes representam diferenças entre grupos. As diferenças são significativas para $P < 0,05$.

Dos parâmetros avaliados, em termos de hábitos relacionados com a alimentação, o “ver TV durante as refeições” foi aquele que se observou poder estar relacionado com o percentil de IMC. Comparando os grupos extremos (“nunca” vs. “sempre”), observou-se que as crianças que veem sempre TV durante as refeições apresentam médias de IMC significativamente mais elevadas ($69,15 \pm 2,38$), comparativamente a crianças que nunca veem ($59,98 \pm 3,33$) ($P = 0,021$).

No entanto, ao contrário do que foi observado, no caso da prática de atividade física programada, “ver TV durante as refeições” não se relaciona com a posição social ($R = 0,0005$; $P = 0,993$), nem com o nível de educação da mãe ($R = 0,070$; $P = 0,169$) nem do pai ($R = 0,035$; $P = 0,503$).

6.3.4. Estilos de vida, obesidade infantil e preferências alimentares

A preferência por 36 itens alimentares diferentes foi avaliada através de questionários contendo o nome e foto dos alimentos em questão (Anexo VIII). Os alimentos preferidos por uma maior percentagem de crianças ($> 90\%$) correspondem principalmente a alimentos ricos em hidratos de carbono e/ou associados a gostos doces, como bolos e bolachas, cereais de pequeno-almoço, massas, pão, arroz,

chocolate e algumas frutas (ex. uvas, morangos). Por sua vez, os alimentos que apresentam menores preferências (<40%) correspondem a alguns vegetais, mais associados a gostos amargos e/ou ácidos, como couves de Bruxelas ou nabiças.

Comparando raparigas com rapazes, apenas foram observadas diferenças estatisticamente significativas, em termos de preferências, nos casos das massas [em que houve maior proporção de raparigas que gostam (98,2%), comparativamente a rapazes que gostam (94%); $P=0,043$] e da coca-cola [em que houve maior proporção de rapazes que gostam (77,5%), comparativamente a raparigas que gostam (66,9%); $P=0,027$]. No entanto, ainda que não se tenham obtido diferenças estatisticamente significativas, observou-se uma tendência para raparigas terem maiores níveis de preferência para alguns alimentos doces (cereais de pequeno almoço e leite com chocolate), e menores níveis de preferência por alguns dos vegetais mais associados aos gostos amargo e/ou ácido (couves de Bruxelas e agriões), comparativamente aos rapazes (Tabela 6.6).

No que diz respeito à relação entre IMC e preferências alimentares, observou-se que crianças com excesso de peso têm menores preferências por diversos vegetais e maior preferência por lácteos, comparativamente a crianças normoponderais. Para alguns alimentos a diferença observou-se quer a nível de crianças com pré-obesidade, quer a nível de crianças obesas, enquanto para outros alimentos essa diferença só se observou nas crianças obesas (Tabela 6.6).

Dos diversos parâmetros avaliados, relacionados com comportamentos relativos à alimentação, “ver TV durante as refeições” foi o único que apresentou relação com as preferências pelos alimentos avaliados nos questionários (Tabela 6.6). Neste caso, observou-se uma maior proporção de crianças a gostar de diversos tipos de vegetais e frutos, mais associados aos gostos amargo/ácido, no grupo que não vê TV às refeições, comparativamente ao grupo que vê. Já no caso de alimentos como o leite com chocolate, é no grupo de crianças que vê habitualmente TV durante as refeições que se observou a maior proporção de indivíduos com elevados níveis de preferência.

Tabela 6.6 – Proporção de indivíduos (%) com elevados níveis de preferência pelos diversos alimentos avaliados

Alimento	Ver TV às refeições			Sexo			Percentil IMC			
	Não	Sim	P	rapazes	raparigas	P	Normoponderais	Pré-obesos	obesos	P
<i>Morangos</i>	92,1	90,9	0,835	90,2	90,1	0,960	90,9	85,1	93,9	0,226
<i>Maças</i>	97,4	90,9	0,206	93,0	92,3	0,776	94,0	90,3	89,6	0,393
<i>Espinafres</i>	50,0	48,5	0,882	46,2	45,5	0,891	45,2	50,0	44,9	0,763
<i>Cenouras cozidas</i>	75,7	46,9	0,0005**	58,2	50,9	0,167	57,2	58,9	34,0	0,010*
<i>logurtes de aromas</i>	92,1	77,3	0,054	83,7	83,5	0,966	81,4	89,0	85,4	0,285
<i>Couve coração</i>	63,9	34,8	0,005*	45,9	50,9	0,351	49,1 [#]	54,2	35,4 [#]	0,120
<i>Couves de Bruxelas</i>	46,7	21,1	0,013*	25,7	17,2	0,088	21,5	21,1	22,5	0,985
<i>Chocolate</i>	89,5	95,4	0,250	92,5	92,4	0,966	90,5	95,9		0,070
<i>Laranjas</i>	86,5	84,8	0,821	83,2	84,8	0,690	84,0	81,1	87,8	0,614
<i>Nabiças</i>	37,9	28,8	0,388	28,7	30,3	0,745	28,2	35,8	27,1	0,455
<i>Kiwis</i>	69,4	65,6	0,695	65,3	61,4	0,459	64,0	64,8	59,6	0,825
<i>Espargos</i>	59,3	33,9	0,027*	38,8	32,8	0,293	35,8	37,1	37,2	0,973
<i>Couve-flor</i>	51,5	34,4	0,103	42,4	47,2	0,377	42,3	57,6	40,4	0,072
<i>Cenoura crua</i>	69,4	55,4	0,166	63,7	71,2	0,136	69,0	72,6	50,0	0,021*
<i>Agríões</i>	50,0	40,4	0,388	43,9	35,9	0,146	36,8	36,4	53,5	0,152
<i>Leite simples</i>	70,3	79,4	0,304	79,9	74,1	0,200	76,6	82,4	79,6	0,338

<i>Meloa</i>	89,5	84,1	0,451	81,6	83,5	0,629	83,6	80,6	82,0	0,834
<i>Batatas cozidas</i>	89,5	82,8	0,358	83,5	86,4	0,452	82,4	87,7	91,8	0,184
<i>Brócolos</i>	63,9	48,4	0,137	53,6	57,9	0,424	56,1	60,6	49,0	0,454
<i>Leite com chocolate</i>	86,8	96,9	0,053	89,1	92,9	0,206	88,5	95,2		0,040*
<i>Pepino</i>	52,6	39,7	0,205	44,6	51,0	0,245	47,9	52,2	41,3	0,520
<i>Ervilhas</i>	77,8	56,9	0,036*	63,2	62,1	0,838	63,2	57,7	68,0	0,505
<i>Massas</i>	---	---	---	94,0	98,2	0,043*	---	---	---	---
<i>Cereais de pequeno almoço</i>	---	----	---	94,5	97,6	0,143	---	---	---	---
<i>Coca-cola</i>	80,6	82,5	0,806	77,5	66,9	0,027*	70,5	73,9	78,0	0,536
<i>Bolos e bolachas</i>	---	----	---	93,4	92,3	0,679	---	---	---	---
<i>Tomate</i>	70,3	61,9	0,397	60,8	56,0	0,370	58,4	61,4	57,1	0,874
<i>Uvas</i>	97,3	85,9	0,066	90,1	91,1	0,758	92,2	88,7	85,1	0,272
Grupos de alimentos										
<i>Vegetais "amargos"</i>	52,6	33,3	0,053	37,2	34,7	0,619	36,9	39,7	28,0	0,387
<i>Vegetais "doces"</i>	70,3	53,0	0,088	59,7	56,7	0,572	59,1	63,5	44,9	0,106
<i>Lácteos</i>	89,5	87,9	0,806	89,9	91,9	0,518	88,0	97,3	94,0	0,039*
<i>Frutos "ácidos"</i>	92,1	86,4	0,377	85,6	85,4	0,961	86,7	81,1	85,7	0,491

- as diferenças nas proporções entre os grupos "normoponderais" e "obesos" apresentam menor valor de P (P=0,058, no caso da couve coração; P=0,049, no caso dos vegetais amargos); --- alimentos para os quais o N de indivíduos pertencente a um dos níveis de preferência é inferior a 5, não sendo possível avaliar diferenças através de tabelas de contingência (teste do qui-quadrado).

6.3.5. Sensibilidade gustativa e preferências alimentares

Tendo em conta os resultados referidos no ponto anterior, nomeadamente que as preferências para alguns alimentos diferem entre crianças normoponderais e crianças com excesso de peso, a análise da relação entre as sensibilidades gustativas e as preferências alimentares foi feita apenas considerando as crianças normoponderais. O foco neste grupo de IMC deveu-se também a ser aquele no qual se torna mais relevante perceber a relação entre percepção oral do alimento e preferências, por ser a nível das crianças normoponderais que se poderão adotar medidas para adoção de hábitos alimentares saudáveis e prevenção de obesidade.

No caso da sensibilidade para o gosto amargo, ainda que não estatisticamente significativa (para um intervalo de confiança de 95%), observou-se uma tendência para o grupo de raparigas mais sensíveis ao gosto amargo ter maior proporção de crianças que “gostam” das frutas incluídas no grupo de “frutas ácidas”. Em termos de preferência para os vegetais amargos, foi observada a mesma tendência. No caso dos rapazes, isto não se observou (Tabela 6.7).

Entre grupos de sensibilidade para o doce já existe maior número de diferenças significativas, no que respeita à proporção de crianças com preferência para cada um dos alimentos avaliados, comparativamente aos grupos de sensibilidade para o amargo (tabela 6.7). No caso do gosto doce, foi também para as raparigas que se observaram as maiores diferenças, entre sensíveis e pouco sensíveis, na proporção que prefere alguns alimentos. É o caso dos vegetais amargos, em que foi o grupo de raparigas sensíveis para o doce que apresentou maior proporção de crianças que “gostam”; e o caso dos lácteos, em que o grupo de raparigas sensíveis para o doce apresentou menor proporção de crianças que “gostam”.

Tabela 6.7 - Proporção de indivíduos (%) com elevados níveis de preferência pelos diversos alimentos avaliados de acordo com as sensibilidades para os gostos doce e amargo.

Alimento	Sensibilidade para o gosto amargo						Sensibilidade para o gosto doce					
	Rapazes			Raparigas			Rapazes			Raparigas		
	SS	PS	P	SS	PS	P	SS	PS	P	SS	PS	P
Morangos	84,6	91,5	0,259	97,0	93,1	0,436	90,5	86,8	0,559	97,5	90,2	0,156
Maçãs	88,7	96,7	0,094	90,9	96,6	0,256	95,2	92,4	0,550	97,5	93,4	0,358
Espinafres	50,0	47,5	0,794	43,8	43,1	0,953	39,0	50,6	0,227	47,4	41,0	0,533
Cenouras cozidas	57,7	65,5	0,399	54,5	53,4	0,920	57,5	62,3	0,611	50,0	54,1	0,687
logurtes de aromas	79,2	88,3	0,188	75,8	81,0	0,552	85,4	83,5	0,795	69,2	82,0	0,140
Couve coração	51,9	47,5	0,639	63,3	43,9	0,084	45,0	50,0	0,607	54,1	47,5	0,529
Couves de Bruxelas	26,2	26,1	0,991	25,0	16,7	0,426	17,6	27,9	0,265	28,6	10,6	0,047*
Chocolate	90,6	90,2	0,942	87,9	91,4	0,591	90,5	89,9	0,916	84,6	95,1	0,074
Laranjas	76,9	88,3	0,109	87,9	87,9	0,994	83,3	83,1	0,973	82,5	85,2	0,712
Nabiças	30,4	36,0	0,563	25,0	25,9	0,927	29,4	34,3	0,619	40,0	13,0	0,003*
Kiwis	62,0	66,7	0,619	69,0	60,4	0,440	60,5	67,6	0,460	65,8	58,5	0,480
Espargos	40,9	42,6	0,874	30,0	28,9	0,928	30,6	47,5	0,101	36,7	18,6	0,084
Couve-flor	37,0	49,2	0,211	45,2	43,1	0,852	42,1	41,3	0,937	39,5	42,4	0,777
Cenoura crua	50,0	73,7	0,012*	84,8	72,4	0,176	64,1	61,3	0,772	80,0	73,8	0,472
Agriões	45,7	42,6	0,763	37,9	29,8	0,448	37,1	45,3	0,432	47,4	21,8	0,010*
Leite simples	74,0	79,3	0,514	68,8	75,4	0,495	77,5	78,4	0,914	60,0	79,7	0,033*

Meloa	86,0	76,3	0,199	93,8	86,0	0,264	87,5	78,7	0,243	87,5	84,7	0,700
Batatas cozidas	80,4	80,0	0,959	78,8	87,5	0,276	78,0	82,9	0,522	87,5	78,0	0,227
Brócolos	54,0	56,9	0,763	60,0	50,9	0,417	50,0	59,5	0,331	63,2	48,3	0,152
Leite com chocolate	82,0	90,2	0,211	84,8	93,0	0,215	88,1	86,7	0,825	82,1	96,7	0,013*
Pepino	42,9	43,1	0,980	62,1	54,7	0,520	38,5	47,3	0,369	58,3	50,0	0,434
Ervilhas	62,3	65,0	0,763	66,7	61,8	0,647	65,9	61,5	0,643	59,0	64,4	0,587
Coca-cola	74,5	79,3	0,552	68,8	63,6	0,628	78,6	76,6	0,751	56,4	67,2	0,279
Tomate	61,5	61,7	0,989	56,3	55,6	0,950	59,5	63,6	0,658	42,1	58,6	0,113
Uvas	87,0	95,1	0,126	90,9	92,6	0,779	88,4	93,7	0,308	89,5	93,2	0,513
Grupos de alimentos												
Vegetais "amargos"	40,7	39,3	0,879	43,8	29,3	0,168	27,9	45,6	0,056	46,2	26,2	0,040*
Vegetais "doces"	54,7	66,7	0,194	60,6	56,9	0,730	63,4	59,5	0,676	60,0	52,5	0,456
Lácteos	83,3	91,8	0,166	87,9	89,7	0,794	86,0	89,9	0,526	80,0	93,4	0,041*
Frutos "ácidos"	81,1	86,9	0,401	97,0	86,2	0,098	83,3	84,8	0,832	87,5	88,5	0,876

SS – sensíveis; PS – pouco sensíveis

6.4. Discussão

O objetivo deste estudo consistiu em avaliar a existência de relação entre a sensibilidade para os gostos doce e amargo e as preferências por diferentes alimentos, em crianças de 8-9 anos de idade. Tendo em conta que a obesidade infantil está associada a diversos fatores, para além dos hábitos alimentares (Lamy *et al.*, 2016), parâmetros socioeconómicos, hábitos de prática de atividade física e hábitos associados à alimentação, foram avaliados, bem como a sua possível associação com as preferências alimentares.

Tendo em consideração o total de crianças que participaram no estudo, observou-se que a percentagem de crianças pouco sensíveis é superior à percentagem de sensíveis. Isto verificou-se tanto para o gosto amargo, como para o gosto doce. Estudos anteriores observaram uma proporção inversa, encontrando maior percentagem de crianças sensíveis, comparativamente a pouco sensíveis, para os gostos doce e amargo (Keller *et al.*, 2004; Keller *et al.*, 2010). Esta diferença nos resultados pode dever-se ao facto dos estudos serem feitos em populações diferentes, com diferentes hábitos alimentares, e diferente metodologia utilizada na classificação da sensibilidade gustativa. De realçar que neste estudo não se observou correlação entre limiares de sacarose e cafeína. Estes resultados são contrários aos de um estudo que refere a existência de correlação entre limiares de deteção do gosto doce e do gosto amargo (Furquim *et al.*, 2010). No entanto, no referido estudo a sensibilidade para o gosto amargo foi avaliada através dos limiares de deteção do composto PTC, enquanto no presente estudo a avaliação foi feita com cafeína, podendo haver falta de relação entre a perceção destes diferentes compostos amargos, uma vez que os genes envolvidos na codificação dos respetivos recetores são diferentes (Reed *et al.*, 2010). A relação entre a perceção e/ou preferência pelos gostos doce e amargo não apresentou consenso também noutros estudos: alguns investigadores reportaram que crianças geneticamente sensíveis ao amargo apresentaram preferência por soluções com elevada concentração de sacarose (Mennella *et al.*, 2005), enquanto outros referiram crianças pouco sensíveis ao amargo do PROP como sendo aquelas que apresentaram maiores preferência por alimentos doces (Looy & Weingarten, 1992). Esta divergência de resultados sugere que sensibilidades e preferências por estes dois gostos dependerão dos compostos que os provocam e que os resultados obtidos, para os mesmos gostos, mas através de compostos diferentes não deverão ser generalizados.

Comparando a sensibilidade gustativa entre rapazes e raparigas, não foram observadas diferenças significativas, nem para o gosto amargo, nem para o gosto doce.

Estes resultados são concordantes com resultados de outros estudos onde também não se observaram diferenças entre rapazes e raparigas na sensibilidade para o gosto amargo (Keller *et al.*, 2010; James *et al.*, 1997). No entanto, no que diz respeito ao gosto doce, há referência a maior sensibilidade por parte de raparigas com 8-9 anos comparativamente a rapazes com as mesmas idades (James *et al.*, 1997). Uma maior sensibilidade para o gosto doce da sacarose observou-se também em outros estudos realizados com crianças de 7-12 anos (Cooper *et al.*, 1959).

No presente estudo não se observaram diferenças estatisticamente significativas na sensibilidade gustativa entre grupos diferentes de percentil de IMC. No entanto, observou-se uma tendência para crianças obesas terem maior proporção de indivíduos sensíveis para o gosto amargo do que crianças normoponderais. Vários estudos têm tentado relacionar sensibilidade gustativa com o desenvolvimento de obesidade, mas os resultados não são consensuais. Keller *et al.* (2002) não observaram diferenças no peso corporal de crianças em função da sensibilidade para o PROP, ao contrário de outros autores que observaram que rapazes pouco sensíveis possuem um percentil de IMC mais elevado que rapazes sensíveis, enquanto que nas raparigas acontece o contrário, sendo as raparigas sensíveis ao amargo as que apresentaram elevado percentil de IMC, comparativamente a pouco sensíveis (Keller & Tepper 2004). Esta diferente relação entre sensibilidade gustativa e IMC, em função do sexo, é confirmada pelo grupo de Keller (Keller *et al.*, 2010), que observou a existência de interações entre sexo, genótipo PROP (ou seja, genótipo para o recetor amargo TAS2R38) e fenótipo PROP no percentil de IMC. No entanto, o motivo pelo qual isto acontece não está explicado.

Poder-se-ia tentar explicar a tendência para maior sensibilidade para o gosto amargo em crianças obesas, se fosse considerado que esta maior sensibilidade poderia servir como “travão” para o consumo de alimentos tipicamente mais amargos, como os vegetais, que são também menos calóricos. Efetivamente, alguns estudos referiram menor consumo de vegetais por parte de crianças mais sensíveis para o gosto amargo (Bell & Tepper, 2006). No presente trabalho, ainda que a relação entre a sensibilidade para o gosto amargo e as preferências por vegetais não tenha sido muito evidente, observámos menor preferência por vegetais “amargos” por parte das crianças obesas, comparativamente a normoponderais, o que sustenta a hipótese de maior sensibilidade ao amargo, nos obesos, levar a menores preferências por vegetais e maior percentil de IMC.

No que diz respeito ao gosto doce, ao contrário de alguns autores, que referem uma associação inversa entre sensibilidade gustativa e IMC (Sartor *et al.*, 2011), mas no sentido de outros (Navabi & Hamzeh, 2008), no presente estudo não foram observadas diferenças na proporção de crianças sensíveis entre normoponderais e obesas.

No que diz respeito à relação entre as preferências alimentares e percentil de IMC, observou-se que crianças com pré-obesidade e crianças obesas têm menor preferência por diversos vegetais, comparativamente a crianças normoponderais. Este resultado é concordante com os resultados obtidos no estudo de Wardle *et al.* (2001), no qual observaram que crianças de famílias com excesso de peso, apresentam maior preferência por alimentos ricos em gordura e menor preferência por vegetais. Lanfer *et al.* (2012), observaram que raparigas obesas e com excesso de peso têm preferência por alimentos doces e ricos em gordura. O mesmo foi sugerido em adultos, por Bartoshuk *et al.* (2006).

O nível socioeconómico tem sido negativamente correlacionado com o desenvolvimento de obesidade, quer em crianças (Shrewsbury & Wardle, 2008), quer em adultos (Wardle *et al.*, 2002). Esta associação é explicada pelo facto dos alimentos mais calóricos e mais palatáveis serem, normalmente, alimentos mais processados, associados a níveis de açúcar, sal e gordura mais elevados e com preços mais baixos (Rao *et al.*, 2013; Drewnowski & Specter, 2004). Para além disso, esta maior palatabilidade está associada a maior sensação de “recompensa” desencadeada pelo consumo destes alimentos, o que leva a que pessoas de condições socioeconómicas mais baixas, que são referidas como tendo maior suscetibilidade para apresentar *stress* e depressão, os possam procurar (Everson *et al.*, 2002; Torres & Nowson, 2007). Neste trabalho foi avaliado a relação entre a posição social da mãe e o percentil de IMC. Observou-se que crianças filhas de mãe com posição social mais baixa, apresentaram percentil de IMC mais elevado. Estes resultados são concordantes com outros estudos presentes na literatura (Lamerz *et al.*, 2005; Shrewsbury & Wardle, 2008). Uma revisão realizada por McLaren (2007) observou que pessoas de grupos socioeconómicos mais elevados praticavam uma dieta mais saudável, caracterizada pelo consumo mais elevado de fruta e vegetais e um menor consumo de alimentos ricos em gordura. Esta situação reflete a capacidade económica para comprar esse tipo de alimentos, já que os mesmos são mais dispendiosos que alimentos menos ricos nutricionalmente (McLaren, 2007).

Foi observado uma correlação positiva, embora fraca, entre a frequência de atividade física programada e a posição social e entre a atividade física programada e o nível de escolaridade da mãe. Além disso, verificou-se que crianças cujas mães

possuem nível de escolaridade igual ou superior à licenciatura apresentaram percentil IMC mais baixo. O facto das mães pertencerem a uma posição social mais elevada e com mais habilitações literárias, provavelmente, faz com que as mesmas tenham hábitos alimentares mais saudáveis e também maior capacidade económica para disponibilizar aos filhos a prática de atividade física programada durante mais dias por semana.

Foi também observado que, em média, crianças com maior percentil de IMC praticam atividade física mais vezes por semana. Neste caso, devemos ter em atenção que provavelmente não é a prática de atividade física que conduz a um percentil de IMC mais elevado, mas sim o facto de haver uma preocupação acrescida, da parte dos educadores, em inscrever as crianças num maior número de atividades físicas. Além disso, o facto da criança estar inscrita num maior número de atividades físicas não significa necessariamente uma diminuição no percentil de IMC, pois não foi avaliado nem o tipo de exercício, nem a forma como o mesmo é praticado.

Um dos principais objetivos do presente estudo foi avaliar a existência de relação entre sensibilidade gustativa e preferências alimentares. Ainda que muitos autores refiram a existência de relação entre estes parâmetros (Keller *et al.*, 2002; Bell and Tepper, 2006; Monneuse *et al.*, 2008), os resultados nem sempre são concordantes e muitos desses estudos baseiam-se em preferências pelos gostos (Lanfer *et al.*, 2012) e não por alimentos normalmente encontrados na alimentação das crianças. Ao contrário do que se observou em diversos estudos (Turnbull and Matisoo-Smith, 2002; Bell and Tepper, 2006; Sandell *et al.*, 2014), não é a sensibilidade para o gosto amargo que parece estar relacionada com a preferência por alimentos amargos, mas sim a sensibilidade para o gosto doce. Curiosamente, no presente trabalho foi observada relação entre a sensibilidade para o gosto doce e a preferência por vegetais amargos e por lácteos, com as raparigas mais sensíveis para o gosto doce a terem níveis de preferência mais elevados para vegetais e menores níveis de preferências para lácteos, que estão normalmente associados a alimentos mais calóricos. A associação positiva entre sensibilidade para o gosto doce e preferência por vegetais amargos, que seja do nosso conhecimento, não foi referida anteriormente. Uma das hipóteses para esta relação poderá ter a ver com o facto dos vegetais, mesmo quando maioritariamente amargos e/ou ácidos, serem uma matriz sensorial, onde outras sensações e gostos, incluindo o doce, estão presentes, ainda que em níveis diminutos. Alguns estudos demonstram que o doce atenua a aversão provocada pelo gosto amargo, em adultos, através de ação nas vias gustativas do sistema nervoso central (a nível cognitivo) (Mennella *et al.*, 2015). Assim, é possível que raparigas com maior sensibilidade para o doce (ou seja, capazes de perceber este gosto, mesmo quando o mesmo está

presente em baixas concentrações) possam retirar mais prazer associado ao doce (Beauchamp & Cowart, 1987) O porquê disto se observar em raparigas e não em rapazes fica por compreender. A maior preferência pelos lácteos avaliados no questionário (associados a doce) relacionada com menor sensibilidade para o gosto doce vai de encontro a alguns estudos que referem que indivíduos menos sensíveis para o gosto doce tendem a consumir níveis de doce mais elevados com o objetivo de conseguirem a mesma sensação gustativa que os que são mais sensíveis (Yoshiko & Roswith)

No início desta discussão foi referida uma tendência para diferentes sensibilidades para o gosto amargo entre crianças normoponderais e crianças com excesso de peso, e uma ausência de relação entre sensibilidade para o gosto doce e percentil de IMC. De acordo com os resultados acima apresentados, acerca da associação que a sensibilidade para o gosto doce tem com as preferências alimentares, poderia esperar-se que essa mesma sensibilidade se refletisse no percentil de IMC. O motivo pelo qual isso não se observa deve ser analisado tendo em conta que o IMC não tem, necessariamente, que refletir as preferências alimentares. No presente trabalho não foi feita a avaliação dos padrões de ingestão destas crianças e uma hipótese é que os hábitos alimentares não reflitam as preferências, uma vez que nas crianças as escolhas alimentares são grandemente influenciadas pelos pais e educadores (Scaglioni *et al.*, 2008).

Tendo em conta que as preferências alimentares, para além da perceção oral, são influenciadas por uma diversidade de fatores, como por exemplo fatores socioeconómicos, hábitos alimentares e de atividade física (Neumark-Sztainer *et al.*, 1999), no presente foi avaliada a relação entre os parâmetros relacionados com estilos de vida e as preferências alimentares.

Foi no parâmetro “assistir TV durante as refeições” que se encontraram diferenças nas preferências por alguns alimentos, entre crianças com comportamentos diferentes, bem como no percentil de IMC. A obesidade é um dos exemplos mais discutidos acerca dos efeitos negativos de assistir televisão às refeições. Existem vários estudos na bibliografia que relacionaram o hábito de assistir televisão durante as refeições e a obesidade em crianças (Robinson, 1999; Marshall *et al.*, 2004; Epstein *et al.*, 2008; Lissner *et al.*, 2012). Os resultados obtidos nestes estudos estão de acordo com o observado neste estudo, na medida em que foram as crianças que veem televisão durante as refeições aquelas que apresentaram uma média de percentil IMC mais elevada, comparativamente a crianças que nunca veem TV às refeições. Além disso, foi

também observado que crianças que não veem TV às refeições gostam mais de vegetais e frutas associados aos gostos amargo e ácido e crianças que veem TV às refeições gostam mais de leite com chocolate. Esta associação com a preferência por este tipo de alimentos contribui para o aumento de peso. Hare-Brunn *et al.* (2011), também observaram que crianças que passam mais tempo a assistir TV têm preferência por alimentos menos saudáveis.

A relação entre a obesidade e o assistir televisão durante as refeições, pode ser resultado de um aumento e ingestão de alimentos enquanto vê TV ou resultado de um menor gasto energético por parte das crianças que veem TV durante as refeições. Os mecanismos dos efeitos da televisão na obesidade incluem um aumento de padrões sedentários e um consumo excessivo passivo devido à interrupção da regulação da ingestão alimentar pela televisão (Lissner *et al.*, 2012).

6.5. Conclusão

A percepção sensorial tem vindo a ser referida como um dos principais determinantes das escolhas alimentares e, conseqüentemente, do desenvolvimento de doenças relacionadas com o estado nutricional, como a obesidade. No entanto, a relação entre sensibilidade gustativa e preferências e consumo alimentar não apresenta consenso entre diferentes autores. Por esse motivo, neste estudo, a relação entre as sensibilidades para os gostos amargo e doce e as preferências por vários alimentos foi avaliada em crianças com 8-9 anos.

Neste trabalho, o gosto amargo não foi o observado como mais diretamente relacionado com as preferências por vegetais, sendo as mesmas, principalmente, influenciadas pelo gosto doce. No entanto, a sensibilidade para o gosto amargo parece ser um fator importante no que diz respeito ao desenvolvimento de obesidade infantil, na medida em foi observada maior percentagem de crianças sensíveis no grupo daquelas que apresentam excesso de peso, do que no grupo das normoponderais.

A influência dos fatores socioeconómicos no desenvolvimento da obesidade foi também observada neste trabalho, com maior percentagem de crianças com excesso de peso associadas a uma posição social mais baixa. Pelo contrário, comportamentos relacionados com hábitos alimentares, como ver televisão durante as refeições, é também um fator de risco no desenvolvimento da obesidade infantil.

Há estudos onde foram observadas diferenças entre países diferentes nessa relação, possivelmente devido aos hábitos alimentares. Que seja do nosso conhecimento, este é o primeiro estudo em que a sensibilidade gustativa é relacionada com preferências alimentares em crianças portuguesas.

Capítulo 7

**Relação entre a composição proteica da saliva e a sensibilidade
para os gostos doce e amargo em crianças**

7.1. Introdução

A promoção de hábitos alimentares saudáveis é uma das chaves para o combate à obesidade e excesso de peso, sendo o aumento desta doença particularmente preocupante em crianças. As preferências e escolhas alimentares resultam da interação de diversos fatores, tais como a percepção sensorial durante a alimentação, contexto emocional durante a ingestão de alimentos e hábitos culturais (Lamy *et al.*, 2016). Diversos estudos têm-se centrado na relação entre a percepção gustativa e preferências alimentares em crianças, devido ao seu impacto na dieta. Tem sido referido que o gosto amargo é uma das principais causas de rejeição de alguns vegetais (Drewnowski & Gomez-Carneros 2000). No entanto, no capítulo anterior (capítulo 6) a relação encontrada entre sensibilidade para o gosto amargo e preferências alimentares não foi forte, nem no sentido do consumo de legumes ser negativamente influenciado pela sensibilidade para o gosto amargo. A falta de consenso entre os diversos estudos pode dever-se a diferentes formas de avaliar percepção gustativa e/ou preferências. No caso dos estudos onde foi observada relação entre a sensibilidade para o gosto amargo e certos alimentos, essa relação foi baseada em testes hedónicos, nos quais as crianças provaram os alimentos, e não apenas nas preferências reportadas (Bell & Tepper, 2006; Turnbull & Matisoo, 2002).

Em adultos, a variabilidade na percepção do gosto amargo pode ser explicada, em parte, pelos polimorfismos que afetam o gene responsável pelo recetor TAS2R38, nomeadamente em posições que codificam os aminoácidos 49, 262 e 296, resultando nos haplótipos mais frequentes PAV (sensíveis) e AVI (não sensíveis) (revisto em Risso *et al.*, 2016). No que diz respeito a crianças também se observaram variações no fenótipo de resposta ao PROP/PTC correlacionadas com o genótipo TAS2R38. No entanto, esta correlação é inferior à observada para adultos, com uma menor proporção de crianças com genótipo AVI a apresentarem um fenótipo de não sensíveis do que o esperado (Galatola *et al.*, 2015).

No que diz respeito ao gosto doce, relacionando a sensibilidade gustativa em crianças com fatores como a idade e sexo, estudos recentes (Bobowski & Mennella, 2015; Joseph *et al.*, 2016) mostraram que estes fatores são determinantes na deteção dos limiares de sacarose. Joseph *et al.* (2016), num estudo realizado com crianças com idades compreendidas entre 7-14 anos, observaram que crianças mais velhas apresentaram menor sensibilidade para o gosto doce, comparativamente a mais novas,

e rapazes são menos sensíveis que raparigas. Além disso, neste estudo observaram ainda que os limiares de deteção de sacarose não estão relacionados com Índice de Massa Corporal (IMC). Estudos recentes demonstraram que, ao contrário do que aconteceu em adultos, em crianças não foi observada relação entre os limiares de deteção da sacarose e variações no gene responsável pelo recetor TAS1R3 (que, juntamente com o TAS1R2, constituem o recetor de gosto doce) (Mennella *et al.*, 2014; Mennella *et al.*, 2012, 2015; Joseph *et al.*, 2016). No entanto, Joseph *et al.*, (2016) mostraram que, embora não se tenha observado uma relação entre a perceção (fenótipo) e o genótipo para o recetor TAS1R3, os limiares de deteção da sacarose estão relacionados com variações no gene responsável pelo recetor do gosto amargo (TAS2R38) em crianças.

Tal como foi referido anteriormente, a perceção oral, em geral, e a sensibilidade gustativa, em particular, podem ser influenciadas por outros fatores para além dos fatores genéticos, nomeadamente composição da saliva e as propriedades físicas, número, tamanho e morfologia das papilas gustativas (Tepper *et al.*, 2014). No que diz respeito à saliva, algumas proteínas salivares, além de estarem envolvidas em processos como a digestão e proteção da cavidade oral (Humphrey & Williamson 2001), desempenham um papel ao nível da perceção gustativa, como é o caso de CA-VI (Patrikainen *et al.*, 2014), cistatinas (Dsamou *et al.*, 2012), PRPs (Cabras *et al.*, 2012; Melis *et al.*, 2013) e histatinas (Yan & Bennick, 1995). Os estudos referidos dizem respeito a adultos e que seja do nosso conhecimento, no caso das crianças a influência das proteínas salivares na perceção gustativa está menos estudada. Há, no entanto, um estudo que refere diferenças no perfil proteico de crianças com diferentes níveis de aceitação para o gosto amargo (Morzel *et al.*, 2014), sugerindo que nesta faixa etária possa haver também relação entre a composição proteica da saliva e a perceção gustativa. Nesse estudo, foram referidas as proteínas zinco- α -2-glicoproteína e CA-VI como estando associadas a uma baixa aceitação para o amargo, enquanto que as proteínas lactoperoxidase, proteína induzida por prolactina (PIP) e cistatina tipo S são sugeridas como estando associadas a uma elevada aceitação para este gosto.

A dificuldade em extrapolar a existência de relação entre a perceção gustativa e a composição salivar em crianças, a partir dos resultados obtidos em adultos, tem a ver com o facto da composição salivar e a aceitação das características sensoriais dos alimentos sofrerem alterações durante a infância. Há estudos que mostram que a composição proteica e peptídica da saliva começa a sofrer alterações desde o nascimento (Castagnola *et al.*, 2011) e a aceitação do gosto um processo que se desenvolve entre os 3 e os 6 meses de idade (Schwartz *et al.*, 2009). James *et al.* (1997),

demonstraram que, embora desenvolvida, a sensibilidade gustativa em crianças de 8-9 anos de idade não está completamente maturada, comparativamente à sensibilidade gustativa de adultos.

O trabalho apresentado neste capítulo tem como objetivo avaliar a relação entre a composição salivar e a sensibilidade para os gostos doce e amargo em crianças, e se essa relação, a existir, é influenciada pelo percentil de IMC.

7.2. Materiais e métodos

7.2.1. Indivíduos em estudo

Trezentas e oitenta e sete crianças caucasianas (199 rapazes e 188 raparigas), com idades compreendidas entre 8-9 anos, aparentemente saudáveis, participaram voluntariamente no estudo que compreende a realização de testes de sensibilidade gustativa e recolha de saliva.

7.2.2. Estímulo gustativo, procedimento sensorial e recolha de saliva

O procedimento para avaliação das sensibilidades para os gostos doce e amargo encontra-se descrito no capítulo 6.

Antes da realização dos testes de sensibilidade gustativa, foi recolhida saliva mista, diretamente da boca, na ausência de estimulação, para um tubo mantido em gelo. Para isso, foi pedido a cada uma das crianças que lavassem a boca com água destilada, num protocolo semelhante ao descrito anteriormente para adultos, durante um período de 4 minutos. Os tubos contendo saliva foram posteriormente armazenados a -20°C, até análise laboratorial.

7.2.3. Determinação da concentração proteica e níveis de glucose salivar

A taxa de fluxo salivar e a concentração em proteína total foram determinados para as 387 crianças, enquanto que os níveis de glucose salivar foram avaliados numa subamostra de 98 crianças (51 rapazes e 47 raparigas), em duplicado. Para posterior determinação da taxa de secreção salivar, foi determinado o peso da saliva recolhida

durante os cinco minutos, considerando a densidade deste fluido cerca de 1g/mL. Após a pesagem, os tubos de recolha foram armazenados a -20°C.

Pela viscosidade ser uma das características intrínsecas à saliva total humana, devido à presença principalmente de mucinas (maioritariamente glicoproteínas de elevada massa molecular), as amostras de saliva foram descongeladas em gelo e centrifugadas durante 30 minutos, 4°C, 13000g, para remoção das mesmas. O sobrenadante resultante da centrifugação das duas recolhas de cada indivíduo, foi misturado num pull, dividido em alíquotas e armazenado a -20°C.

A concentração proteica foi determinada pelo método de *Bradford*, usando o mesmo procedimento anteriormente descrito no capítulo 4.

Os níveis de glucose salivar foram estimados através do *Kit* colorimétrico Glucose (GO) Assay (Sigma-Aldrich, Inc.), o qual se baseia na reação da glucose oxidase. O protocolo original fornecido pelo fabricante foi adaptado para microplacas, com os reagentes adicionados num volume proporcional ao recomendado para cada um deles, perfazendo um volume final de 280µL por poço. Em cada placa foram utilizados padrões de glucose com concentrações entre 2,5-30µg/mL. A absorvância foi medida a 560nm (Glomax, Promega).

7.2.4. Eletroforese unidimensional

Amostras de saliva de 285 crianças (151 rapazes e 134 raparigas), recolhidas antes da realização dos testes de sensibilidade gustativa, foram sujeitas a separação proteica por SDS-PAGE. Essas amostras correspondem a 252 crianças que obtiveram classificação para a sensibilidade gustativa relativa ao amargo [133 rapazes (67 supersensíveis e 66 pouco sensíveis) e 119 raparigas (49 supersensíveis e 70 pouco sensíveis) e 274 crianças que obtiveram classificação para a sensibilidade gustativa ao doce [145 rapazes (49 supersensíveis e 96 pouco sensíveis) e 129 raparigas (47 supersensíveis e 82 pouco sensíveis)]. Da amostra total de 285 crianças, 33 não obtiveram classificação para o amargo e 11 não obtiveram classificação para o doce, tal como referido no capítulo 6.

Cada amostra de saliva foi testada em triplicado. Um total de 7,5µg de proteína de cada amostra de saliva foi aplicado em cada poço de um mini gel de 14% de poliacrilamida (Mini Protean System, Bio-Rad), usando o sistema de tampão *Laemmli* (Laemmli, 1970). A corrida eletroforética decorreu à voltagem constante de 150V até a frente de corrida atingir o final do gel. No final da corrida eletroforética, os géis foram

fixados durante uma hora numa solução de 40% metanol e 10% ácido acético e corados durante duas horas com azul brilhante de *Coomassie* (*Coomassie Brilliant Blue*) (CBB) G-250. As imagens dos géis foram adquiridas através de digitalização com o *scanner* ImageScanner III (GE Healthcare) e o *software* Labscan. As imagens foram analisadas utilizando o *software* GelAnalyzer (GelAnalyzer 2010a by Istvan Lazar, www.gelalyzer.com). As massas moleculares foram determinadas de acordo com o padrão de massas moleculares que correu juntamente com as amostras (*Precision Plus Protein™ Dual Color Standards* 161-0394 Bio-Rad).

7.2.5 Eletroforese bidimensional

Tendo em conta a diversidade de fatores passíveis de serem comparados (sexo, grupo de percentil de IMC, grupo de sensibilidade para o gosto doce e grupo de sensibilidade para o gosto amargo) e dada a complexidade inerente à realização e análise de géis bi-dimensionais, para estes perfis proteicos foram constituídos 16 *pools*:

- *Pool* 1: Raparigas normoponderais sensíveis ao amargo e ao doce;
- *Pool* 2: Raparigas normoponderais pouco sensíveis ao amargo e sensíveis ao doce;
- *Pool* 3: Raparigas normoponderais sensíveis ao amargo e pouco sensíveis ao doce;
- *Pool* 4: Raparigas normoponderais pouco sensíveis ao amargo e ao doce;
- *Pool* 5: Raparigas obesas sensíveis ao amargo e ao doce;
- *Pool* 6: Raparigas obesas pouco sensíveis ao amargo e sensíveis ao doce;
- *Pool* 7: Raparigas obesas sensíveis ao amargo e pouco sensíveis ao doce;
- *Pool* 8: Raparigas obesas pouco sensíveis ao amargo e ao doce;
- *Pool* 9: Rapazes normoponderais sensíveis ao amargo e ao doce;
- *Pool* 10: Rapazes normoponderais pouco sensíveis ao amargo e sensíveis ao doce;
- *Pool* 11: Rapazes normoponderais sensíveis ao amargo e pouco sensíveis ao doce;
- *Pool* 12: Rapazes normoponderais pouco sensíveis ao amargo e ao doce;
- *Pool* 13: Rapazes obesos sensíveis ao amargo e ao doce;
- *Pool* 14: Rapazes obesos pouco sensíveis ao amargo e sensíveis ao doce;
- *Pool* 15: Rapazes obesos sensíveis ao amargo e pouco sensíveis ao doce;
- *Pool* 16: Rapazes obesos pouco sensíveis ao amargo e ao doce;

Os *pools* foram constituídos a partir de amostras de 10 indivíduos diferentes, com exceção dos *pools* 1, 5, 13 e 14, para os quais não existia um número de amostras suficiente, sendo os mesmos constituídos por 6, 5, 7 e 8 indivíduos, respetivamente. A

quantidade de cada amostra individual, constituinte do *pool*, foi calculada de modo a que cada indivíduo contribuisse com a mesma quantidade de proteína. No caso dos *pools* constituídos por 10 indivíduos, cada um contribuiu com 100 µg de proteína, enquanto que nos *pools* 1, 5, 13 e 14, cada indivíduo contribuiu com 200 µg de proteína.

Em cada gel aplicaram-se 175µg de proteína total, de cada *pool*. Foram realizados 3 géis bi-dimensionais para cada *pool*.

O procedimento experimental consistiu, numa primeira fase, em concentrar as amostras de saliva através da centrifugação em membranas com um *cut-off* de 3kDa (Nanosep®, Pall corporation). A concentração foi feita a 4°C e a uma rotação de 14000g pelo tempo necessário para ter uma quantidade de proteína total de 175µg num volume final inferior a 50µL. O protocolo para a reidratação, focagem isoelétrica e segunda dimensão, foi realizado tal como se encontra descrito no protocolo do capítulo 1.

O cálculo das massas moleculares e pontos isoelétricos aparentes foi feito com base no descrito no capítulo 4.

7.2.6. Identificação de proteínas por MALDI TOF/TOF

7.2.6.1. Digestão trípica

As bandas e *spots* proteicos, separados por eletroforese uni- e bi-dimensional, respetivamente, observados diferencialmente expressos foram excisados e digeridos. A digestão trípica foi realizada com base no protocolo definido em Shevchenko *et al.* (2006). Numa primeira fase, as bandas e os *spots* foram excisadas manualmente dos géis, lavadas três vezes com 50% acetonitrilo (ACN) (15 minutos cada lavagem) e uma vez com 100% ACN, durante 15 minutos. As bandas de gel seco foram posteriormente incubadas 45 minutos com 10mM DTT a uma temperatura de 56°C, seguida de incubação, durante 30 minutos, no escuro e à temperatura ambiente, com iodoacetoamida. Após a lavagem com 50% ACN (15 minutos) e ACN 100% (30 minutos), as bandas dos géis foram secas numa centrifuga com vácuo (*SpeedVac*). 15µL de 6,7ng/µL de tripsina porcina (*Sequencing Grade Modified Trypsin Promega*) e 50mM de hidrogenocarbonato de amónio foram adicionados às bandas e incubados durante 45 minutos a 4°C. O excesso de líquido foi removido e 50µL de hidrogenocarbonato de amónio 50mM foi adicionado às bandas e incubado a 37°C durante a noite. Posteriormente, foi feita a acidificação dos digeridos, através da adição de tampão de extração (10% ácido fórmico/50% ACN). O tampão de extração foi adicionado na proporção de 1:2, com incubação a 37°C, durante 15 minutos com

agitação. Após a incubação, recolheu-se o sobrenadante para novo tubo *ependorf* e congelou-se a -20°C até posterior liofilização (em liofilizador Freeze Dryer *Modulyo*).

7.2.6.2. Espectrometria de Massa

A identificação proteica foi realizada através de aquisição de serviço no laboratório de espectrometria de massa, no Instituto de Tecnologia Química e Biológica, da Universidade Nova de Lisboa.

As amostras foram diluídas e concentradas usando uma coluna de fase reversa [Poros R2 (Applied Biosystems)] e eluídas juntamente com a matriz diretamente para a placa MALDI. A matriz utilizada foi α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA; Fluka), a qual foi preparada a uma concentração de 5 mg/ml em 50% (v/v) ACN e 5% de ácido fórmico (v/v).

Os dados foram adquiridos em refletor positivo MS e MS/MS através do espectrómetro de massa MALDI-TOF/TOF (4800plus AB Sciex) e do *software* de análise 4000 Series Explorer, versão 3.5.3 .3 (Applied Biosystems).

A massa dos péptidos monoisotópicos foi determinada usando o algoritmo SNAP 2 na versão 3.4 do *software* de análise (BrukerDaltonics). A calibração externa foi executada usando CalMix5 (Protea). Os trinta iões precursores mais intensos do espectro MS foram selecionados para análise MS/MS.

7.2.6.3. Pesquisa na base de dados

A massa de péptidos monoisotópicos foi usada para pesquisar a identificação proteica através da utilização da versão 4.5 do *software* Protein Pilot (ABSciex) with the Mascot search engine (MOWSE algorithm). A base de dados *Swiss-Prot*, com restrição para *Homo Sapiens* foi utilizada para todas as pesquisas. Uma precisão de massa de 50ppm e uma tolerância de massa de 0,3Da, duas clivagens “em falta”, carbamidometilação de cisteína (modificação fixa) e oxidação de metionina (modificação variável) e modificações de aminoácidos variáveis, respetivamente, foram parâmetros considerados no *input* do *software*. Os critérios utilizados para aceitar a identificação foram a obtenção de uma pontuação de homologia significativa ($p < 0,05$, *score* de proteína superior a 56) e, pelo menos, um péptido fragmentado com *score* individual significativo ($p < 0,05$).

7.2.7. Identificação de cistatinas por nanoLC-MS/MS

A banda proteica observada nos géis SDS-PAGE, com massa molecular aparente de aproximadamente 13kDa (massa molecular teórica das cistatinas) (banda K) foi submetida a identificação proteica por nano LC-MS/MS. Este procedimento realizou-se apenas para esta banda, por serem estas proteínas umas das mais referidas como potencialmente associadas ao gosto, com resultados diferentes em diferentes estudos. Para tal foram constituídos os *pools* com amostras de crianças, tendo em consideração o percentil de IMC e a sensibilidade ao amargo e ao doce, separadamente:

Pool 1- crianças normoponderais sensíveis ao amargo

Pool 2- Crianças normoponderais pouco sensíveis ao amargo

Pool 3- crianças normoponderais sensíveis ao doce

Pool 4- Crianças normoponderais pouco sensíveis ao doce

Pool 5- crianças com excesso de peso sensíveis ao amargo

Pool 6- Crianças com excesso de peso pouco sensíveis ao amargo

Pool 7- crianças com excesso de peso sensíveis ao doce

Pool 8- Crianças com excesso de peso pouco sensíveis ao doce

Os *pools* foram constituídos a partir de amostras de 20 crianças diferentes, de ambos os sexos, sendo que cada amostra contribuiu com 5µg de proteína para o *pool*. Após a determinação da concentração proteica total de cada *pool* (através do método de Bradford, tal como descrito no capítulo 4), as proteínas presentes em cada *pool* foram separadas por eletroforese unidimensional SDS-PAGE (procedimento descrito no capítulo 4), tendo sido aplicado 7,5µg de proteína em cada *lane*. Cada *pool* foi aplicado no gel SDS-PAGE em duplicado. Os géis foram fixados, corados e descorados de acordo com o descrito no ponto 2.4.

Depois dos géis estarem descorados, a banda proteica, com massa molecular aparente de 13kDa (ver figura 7.3 dos resultados), foi excisada manualmente do gel, sendo submetida a digestão trípica, tal como se encontra descrito no ponto 7.2.6.1.

7.2.7.1- Análise por espectrometria de massa tandem (nanoLC-MS/MS)

As amostras foram ressuspensas numa solução de 5% acetonitrilo (ACN)/0,1% ácido fórmico (FA) e analisadas com QExactive Orbitrap (Thermo Fisher Scientific, Bremen), o qual se encontra acoplado ao sistema de HPLC (*high-pressure liquid chromatography*) Ultimate 3000 (Dionex, Sunnyvale, CA). As pré-colunas (5mm X 300µm I.D.) e as colunas analíticas (150mm x 75µm I.D.) utilizadas foram colunas C18 Pepmap100 (Dionex, LC Packings), tendo as colunas partículas com dimensão de 3µm. Os péptidos foram concentrados a 30µL/min em 95% de solvente A (0,1 % FA/5% ACN v/v). A eluição realizou-se com o solvente B (0,1 % FA/100% ACN v/v) a 300nL/min. O gradiente de 50 minutos utilizado foi o seguinte: 0–3 min, 95% solvente A; 3–35 min, 5–45% solvente B; 35–38 min, 45–80% solvente B; 38–39 min, 80% solvente B; 39–40 min, 20–95% solvente A; 40–50 min, 95% solvente A. O *nanospray* foi realizado utilizando um emissor de sílica fundida não revestido (New Objective, Cambridge, MA) (o.d. 360 µm; i.d. 50 µm, tip i.d. 15 µm) a 1,8kV. O espectrómetro de massa atuou no modo de aquisição dependente dos dados. Um método MS2 foi utilizado com varrimento com transformadas de Fourier (*FT survey scan*) de 375 to 1600m/z (resolução 35,000; AGC target 3E6). Os 10 picos mais intensos foram sujeitos a fragmentação com colisões de alta energia (HCD- *Hight Collision Dissociation*) (resolução de 17,500; controle automático de ganho (AGC) de 5E4, energia de colisão normalizada (NCE) de 25%; tempo de injeção máximo de 120 ms, dinâmica de exclusão de 35 s).

7.2.7.2- Processamento de dados

O espectro foi processado e analisado através do *software* Proteome Discoverer (versão 2.0, Thermo), com o motor de busca *MS Amanda engine* (versão 2.1.4.3751, University of Applied Sciences Upper Austria, Research Institute of Molecular Pathology).

As bases de dados *Uniprot* (TrEMBL) e Swiss-Prot (versão Maio 2016), com restrição para *Homo Sapiens* foram utilizadas para todas as pesquisas. Uma precisão de massa de 10ppm e uma tolerância de massa de 0,05Da, duas clivagens “em falta”, carbamidometilação e carboximetil de cisteína (modificação fixa), oxidação de metionina (modificação variável) e modificações de aminoácidos variáveis, respetivamente, foram parâmetros considerados no *input* do *software*. De modo a conseguir um máximo de 1% de falsas identificações, o algoritmo Percolator (version 2.0, Thermo) foi implementado como estratégia de pesquisa e os péptidos foram filtrados com elevada confiança e

comprimento mínimo de 6 aminoácidos. Foram consideradas apenas as proteínas com, no mínimo, dois peptídeos de sequência e apenas peptídeos de grau 1.

7.2.8. Western Blot

A imunodeteção por *Western Blot* foi utilizada para comparação do nível de expressão da proteína salivar cistatina. Amostras de saliva de 58 crianças [33 rapazes (17 sensíveis e 16 pouco sensíveis ao amargo) e 25 raparigas (16 sensíveis e 9 pouco sensíveis ao amargo)] foram analisadas em duplicado. Numa primeira fase, as proteínas foram separadas por SDS-PAGE em géis de 14% poliacrilamida, de 3µg de proteína de cada amostra (de modo semelhante ao descrito anteriormente, e com uma separação a 100V voltagem constante). Seguidamente, efetuou-se a transferência das proteínas para uma membrana de PVDF (fluoreto de polivilideno) por *eletroblotting* (tal como descrito no capítulo 4). Após o bloqueio (que foi realizado de modo semelhante ao descrito no capítulo 4), a membrana foi incubada com o anticorpo primário anti-cistatinas S-SA-SN (sc-73884, Santa Cruz *Biotechnology*; diluição: 1:200), *overnight* a 4°C, e as bandas foram detetadas com um anticorpo secundário ligado a fosfatase alcalina [anti-ratinho (S372B, Promega), com diluição de 1:10000], usando um substrato quimiofluorescente (ECF Plus *Western Blotting Detection Reagents*, GE, Healthcare). As membranas foram reveladas num transiluminador (Bio-Rad Gel-doc system) e a análise semi-quantitativa da expressão das bandas foi realizada através do software Bio-Rad Image Lab 5.2.1.

7.2.9. Tratamento estatístico dos resultados

Todos os dados foram analisados usando estatística descritiva e inferencial e a normalidade e homocedasticidade foram avaliadas através dos testes de Kolmogorov-Sminorff e Levene, respetivamente. Quando os dados não apresentavam normalidade nem homocedasticidade, a análise foi feita recorrendo a testes não paramétricos (Kruskal-Wallis). Para comparação dos parâmetros salivares (taxa de fluxo salivar, concentração em proteína total, concentração de glucose e expressão individual de bandas proteicas de perfis SDS-PAGE) entre grupos com diferente sensibilidade para cada um dos gostos foi realizado o teste T-Student ou correspondente não paramétrico (Mann-Whitney). O coeficiente de correlação de *Spearman* foi utilizado para avaliar a existência de correlação entre os limiares de sacarose e cafeína e entre cada um destes e os parâmetros salivares.

Para a análise *Western blot* para cistatinas e para os perfis uni e bidimensionais, as variáveis foram testadas por Análise de Variância – de acordo com modelo geral linear (GLM) com 2 fatores fixos (sexo e percentil de IMC).

Tendo em conta que foram usados *pools* para avaliação de perfis bidimensionais, foram consideradas diferenças entre grupos (para cada um dos fatores) quando o valor de P obtido através do teste T-Student ou equivalente não paramétrico (Mann-Whitney) era inferior a 0,05 e/ou quando o rácio entre os níveis de expressão dos *spots* (% de volume) dos dois grupos era superior a 2 ou inferior a 0,5. Neste último caso, independentemente do valor de P ou quando $P < 0,05$ (Wetie *et al.*, 2015).

Toda a análise estatística foi realizada com recurso ao software SPSS versão 22.0 (SPSS Inc., Chicago, USA). As diferenças foram consideradas para um intervalo de confiança de 95%.

7.3. Resultados

7.3.1-Composição proteica da saliva

7.3.1.1. Taxa de fluxo salivar, concentração proteica total e níveis de glucose

A concentração proteica salivar ($\mu\text{g/mL}$) não diferiu estatisticamente entre grupos de crianças com diferente sensibilidade para o gosto amargo, tendo em consideração o sexo e ‰ IMC (tabela 7.1). No entanto, tendo em conta a sensibilidade para o doce, observaram-se diferenças significativas entre os grupos de rapazes pré-obesos, sendo que rapazes pouco sensíveis apresentaram concentração proteica mais elevada, comparativamente a sensíveis (tabela 7.2).

A taxa de secreção salivar não diferiu entre grupos de sensibilidade para ambos os gostos, em nenhum dos sexos ou grupo de ‰IMC (tabelas 7.1 e 7.2).

Não se observaram diferenças entre rapazes e raparigas para os níveis de glucose salivar (rapazes: $2,62 \pm 0,33$ vs. Raparigas: $2,68 \pm 0,35 \mu\text{g/mL}$; $P=0,963$). Também em relação ao ‰ de IMC, não se observaram diferenças entre crianças normoponderais, pré-obesas ou obesas em relação a este parâmetro (normoponderais: $2,97 \pm 0,35$; pré-obesos: $2,46 \pm 0,43$; obesos: $1,73 \pm 0,28 \mu\text{g/mL}$; $P=0,155$). O mesmo se observou ao comparar os grupos de sensibilidade entre si. Não foram observadas diferenças nos níveis de glucose salivar nem entre crianças com diferentes sensibilidades para o gosto

amargo, nem entre crianças com diferentes sensibilidades para o gosto doce (tabelas 7.1 e 7.2). Não foi observada correlação entre os limiares de amargo e de doce e os níveis de glucose salivar, tendo em consideração o sexo e percentil de IMC (tabela 7.3).

Tabela 7.1: Comparação da concentração proteica e taxa de secreção salivar entre crianças com diferente sensibilidade para o gosto amargo (valores representados média \pm erro padrão).

Total crianças									
Parâmetros salivares	Normoponderais (média \pm erro padrão)			Pré-obesos (média \pm erro padrão)			Obesos (média \pm erro padrão)		
	Sensíveis	Pouco sensíveis	P	Sensíveis	Pouco sensíveis	P	Sensíveis	Pouco sensíveis	P
Concentração proteica ($\mu\text{g/mL}$)	387,97 \pm 17,33	410,76 \pm 17,14	0,44	421,99 \pm 34,59	400,47 \pm 31,95	0,79	428,13 \pm 35,88	449,46 \pm 40,90	0,57
Taxa secreção salivar (mL/min)	480,65 \pm 36,82	503,18 \pm 31,12	0,62	510,04 \pm 67,99	457,63 \pm 40,28	0,76	566,91 \pm 61,46	452,57 \pm 70,92	0,23
Glucose salivar ($\mu\text{g/mL}$)	3,52 \pm 0,672	2,95 \pm 0,46	0,71	2,89 \pm 0,85	1,78 \pm 0,28	0,86	2,36 \pm 0,59	1,44 \pm 0,29	0,29
Raparigas									
Concentração proteica ($\mu\text{g/mL}$)	407,35 \pm 30,29	409,36 \pm 22,56	0,85	346,64 \pm 36,35	386,85 \pm 51,09	0,61	431,99 \pm 45,30	345,79 \pm 11,97	0,09
Taxa secreção salivar (mL/min)	392,92 \pm 45,77	476,83 \pm 47,74	0,24	371,41 \pm 56,79	377,64 \pm 61,08	0,94	518,88 \pm 91,98	465,13 \pm 106,27	0,70

Glucose salivar ($\mu\text{g/mL}$)	4,26 \pm 1,09	2,93 \pm 0,69	0,30	2,73 \pm 1,34	1,87 \pm 0,43	0,49	2,56 \pm 0,95	1,58 \pm 0,19	0,44
Rapazes									
Concentração proteica ($\mu\text{g/mL}$)	373,33 \pm 20,09	412,09 \pm 25,91	0,36	516,19 \pm 52,99	416,04 \pm 37,44	0,13	424,56 \pm 56,70	461,93 \pm 63,57	0,67
Taxa secreção salivar (mL/min)	538,55 \pm 51,88	527,29 \pm 40,68	0,84	648,67 \pm 114,82	532,62 \pm 47,39	0,35	611,51 \pm 83,66	324,04 \pm 97,70	0,19
Glucose salivar ($\mu\text{g/mL}$)	2,86 \pm 0,80	2,97 \pm 40,64	0,917	2,99 \pm 1,15	1,68 \pm 0,42	0,897	2,12 \pm 0,75	1,14 \pm 0,99	0,503

Tabela 7.2: Comparação da concentração proteica e taxa de secreção salivar entre crianças com diferente sensibilidade para o gosto doce (valores representados média ± erro padrão).

Total crianças									
Parâmetros salivares	Normoponderais (média ± erro padrão)			Pré-obesos (média ± erro padrão)			Obesos (média ± erro padrão)		
	Sensíveis	Pouco sensíveis	P	Sensíveis	Pouco sensíveis	P	Sensíveis	Pouco sensíveis	P
Concentração proteica (µg/mL)	397,63±18,49	395,84±13,08	0,87	342,06±27,82	420,86±26,10	0,07	472,02±57,05	401,93±27,62	0,39
Taxa secreção salivar (mL/min)	484,89±36,94	457,43±25,84	0,51	420,20±48,12	524,02±49,08	0,18	456,22±87,44	540,16±56,52	0,43
Glucose salivar (µg/mL)	3,44±0,61	2,84±0,46	0,43	1,73±0,54	2,29±0,39	0,40	1,66±0,37	2,24±0,59	0,51
Raparigas									
Concentração proteica (µg/mL)	406,49±26,72	405,51±20,69	0,911	334,96±46,38	377,54±39,26	0,807	403,58±58,18	407,19±34,45	0,956
Taxa secreção salivar (mL/min)	472,80±59,26	389,34±31,52	0,219	322,80±57,21	405,46±51,58	0,360	452,76±122,01	498,21±90,09	0,951

Glucose salivar ($\mu\text{g/mL}$)	3,99 \pm 0,89	2,82 \pm 0,79	0,33	234 \pm 1,17	2,08 \pm 0,24	0,84	1,77 \pm 0,50	1,55 \pm 0,28	0,69
Rapazes									
Concentração proteica ($\mu\text{g/mL}$)	389,48 \pm 25,89	387,05 \pm 16,51	0,997	349,94 \pm 31,19	468,52 \pm 31,40	0,029	530,67 \pm 91,79	397,67 \pm 42,50	0,145
Taxa secreção salivar (mL/min)	475,88 \pm 43,37	513,56 \pm 38,3	0,899	482,82 \pm 66,12	642,59 \pm 76,59	0,155	459,67 \pm 133,71	579,65 \pm 70,98	0,393
Glucose salivar ($\mu\text{g/mL}$)	2,88 \pm 0,83	2,85 \pm 0,55	0,77	1,29 \pm 0,41	2,42 \pm 0,65	0,18	1,44 \pm 0,70	2,00 \pm 0,81	0,70

Tabela 7.3- Relação entre os níveis de glucose salivar($\mu\text{g/ml}$) e os limiares de amargo e doce(mg/mL) tendo em conta o sexo e percentil IMC

	Normoponderais						Pré-obesos						Obesos					
	Rapazes		Raparigas		Rapazes		Raparigas		Rapazes		Raparigas		Rapazes		Raparigas			
	R	P	R	P	R	P	R	P	R	P	R	P	R	P	R	P		
Relação entre níveis de glucose e Limiares de cafeína	0,105	0,643	0,100	0,674	0,019	0,953	0,059	0,870	-0,515	0,237	0,184	0,635						
Relação entre níveis de glucose e Limiares de sacarose	-0,123	0,568	-0,042	0,853	0,210	0,453	0,026	0,943	0,342	0,453	-0,184	0,635						

7.3.1.2- Perfil proteico unidimensional (SDS-PAGE)

Comparando o perfil proteico salivar, obtido por SDS-PAGE, observaram-se diferenças significativas entre rapazes e raparigas nos níveis de expressão de algumas bandas proteicas. As bandas F (contendo α -amilase salivar) e K (contendo cistatinas S e SN) (tabela 7.4; figura 7.1) apresentaram expressão mais elevada em rapazes, comparativamente a raparigas [banda F: $11,32 \pm 0,30$ vs. $10,39 \pm 0,29$ ($P=0,036$); banda K: $10,53 \pm 0,27$ vs. $9,49 \pm 0,30$ ($P=0,011$), em rapazes e raparigas, respetivamente]. Por outro lado, as bandas A (contendo macroglobulina α -2;), C (mistura de recetor polimérico de imunoglobulina e lactotransferrina), e F1 (α -amilase) (tabela 7.4; figura 7.1) apresentaram expressão mais elevada em raparigas, comparativamente a rapazes [banda A: $2,64 \pm 0,05$ vs. $2,81 \pm 0,06$ ($P=0,016$); banda C: $6,19 \pm 0,12$ vs. $6,94 \pm 0,16$ ($P=0,0005$); banda F1: $2,78 \pm 0,08$ vs. $3,10 \pm 0,08$ ($P=0,006$), em rapazes e raparigas, respetivamente].

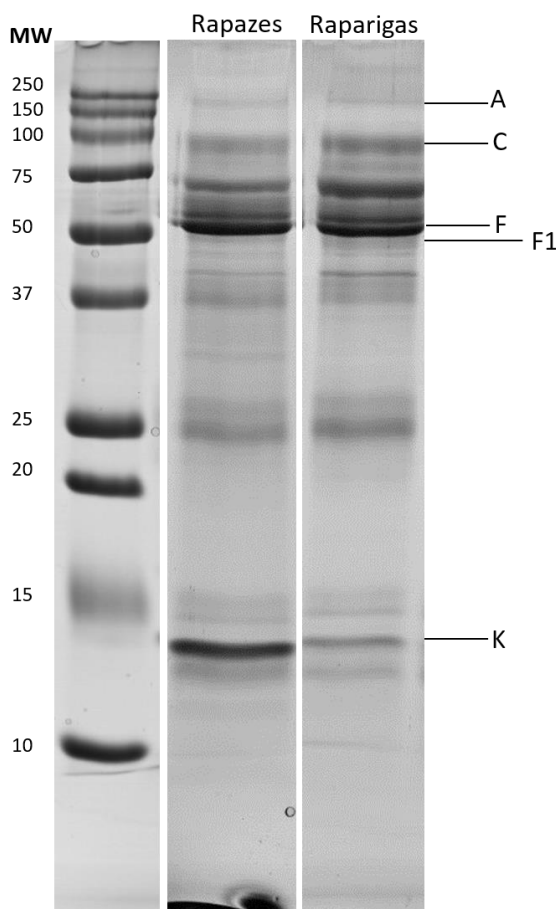


Figura 7.1- Imagem representativa de perfil proteico salivar uni-dimensional (SDS-PAGE) de rapazes e raparigas. As letras correspondem a bandas diferencialmente expressas entre rapazes e raparigas. MW-marcador de massa molecular (kDa).

O nível de expressão das diferentes bandas, separadas por SDS-PAGE, foi comparado entre crianças normoponderais e com excesso de peso (pré-obesas+obesas). Considerando o total de indivíduos (independentemente do sexo), observaram-se duas bandas cuja expressão é mais elevada em crianças normoponderais, comparativamente a excesso de peso: banda G (mistura de CA-VI e zinco- α 2 glicoproteína) e banda J (Proteína induzida por prolactina) (tabela 7.4; figura 7.3) [banda G: $4,02 \pm 0,07$ vs. $3,72 \pm 0,09$ ($P=0,003$); banda J: $4,11 \pm 0,08$ vs. $3,86 \pm 0,11$ ($P=0,031$), normoponderais e excesso de peso, respetivamente]. Por outro lado, uma banda apresentou expressão mais elevada em crianças com excesso de peso, comparativamente a crianças normoponderais: banda E (α -amilase) (tabela 7.4; figura 7.3) [$8,51 \pm 0,13$ vs. $9,23 \pm 0,24$ ($P=0,009$), normoponderais e excesso de peso, respetivamente].

A existência de interação entre os fatores sexo e percentil de IMC foi avaliada, através de GLM. Ainda que só tenha sido observada uma tendência no caso da banda D ($P=0,073$) (figura 7.3), a comparação dos perfis proteicos SDS-PAGE foi feita também em separado para rapazes e raparigas, por se considerar ser informação relevante do ponto de vista biológico. Considerando apenas rapazes, observaram-se diferenças significativas nos níveis de expressão da banda G, sendo a expressão mais elevada em rapazes normoponderais, comparativamente a excesso de peso (normoponderais: $4,06 \pm 0,09$; excesso de peso: $3,63 \pm 0,11$; $P=0,003$), e banda J, sendo a expressão mais elevada em rapazes normoponderais, comparativamente a excesso de peso (normoponderais: $4,18 \pm 0,10$; excesso de peso: $3,80 \pm 0,13$; $P=0,039$). Tendo em conta apenas raparigas, observaram-se diferenças significativas ao nível da banda E, apresentando as raparigas com excesso de peso nível de expressão mais elevado, comparativamente a raparigas normoponderais (normoponderais: $8,33 \pm 0,18$; excesso de peso: $9,38 \pm 0,41$; $P=0,022$).

Tabela 7.4 – Identificação, por espectrometria de massa, das proteínas salivares presentes em bandas diferencialmente expressas entre grupos de sensibilidade.

Banda	Proteína	Referência de entrada <i>uniprot</i>	MW (kDa) estimada/teórica	Score de identificação	Cobertura de sequência (%)	Nº peptídeos <i>matched</i>
A	macroglobulina α -2	P01023	245,7/164,6	110	15	15
C#	Recetor polimérico de imunoglobulina	P01833	90,9/84,4	107	21	13
	Lactotransferrina	Q9H1Z3	80,0/84,4	89	20	11
E	α – amilase 1	P04745	66,4/58,4	154	43	16
F	α – amilase 1	P04745	54,2/58,4	135	31	15
F1	α – amilase 1	P04745	49,7/58,4	177	32	13
G#	CA-VI	P23280	36,6/35,5	150	39	12
	Zinco- α -2 glicoproteína	P25311	36,6/34,5	71	30	8
H	Proteína grânulo de zimogénio	Q96DA0	26,5/22,7	77	30	6
J	Proteína induzida por prolactina (PIP)	P12273	15,3/16,8	131	60	8
K#	Cistatina SN	P01037	13,0/16,6	110	54	7
	Cistatina S	P01036	13,0/16,5	109	58	7

A banda proteica foi identificada como contendo uma mistura de mais do que uma proteína

7.3.1.2.1- Perfil unidimensional (SDS-PAGE) entre grupos de sensibilidade para o gosto amargo

Comparando crianças com diferente sensibilidade gustativa para o amargo, observaram-se diferenças significativas entre grupos ao nível da banda K (figura 7.3).

Considerando o total de crianças normoponderais, o nível de expressão foi observado como estando significativamente mais elevado nas crianças sensíveis, comparativamente às pouco sensíveis [sensíveis: $10,77 \pm 0,408$; pouco sensíveis: $9,63 \pm 0,35$ ($P=0,033$)]. O mesmo foi observado considerando apenas rapazes

normoponderais [sensíveis: $11,46 \pm 0,52$; pouco sensíveis: $9,79 \pm 0,49$ ($P=0,022$)]. Considerando o total de crianças com excesso de peso (pré-obesos+obesos), observou-se uma tendência para esta banda apresentar expressão mais elevada em crianças pouco sensíveis [sensíveis: $9,32 \pm 0,49$; pouco sensíveis: $10,64 \pm 0,59$ ($P=0,090$)]. O mesmo se observou tendo em consideração apenas rapazes [sensíveis: $9,58 \pm 0,65$; pouco sensíveis: $12,01 \pm 0,61$ ($P=0,019$)] (figura 7.2).

Nas raparigas, esta banda não se encontrou diferencialmente expressa entre grupos de sensibilidade para o gosto amargo.

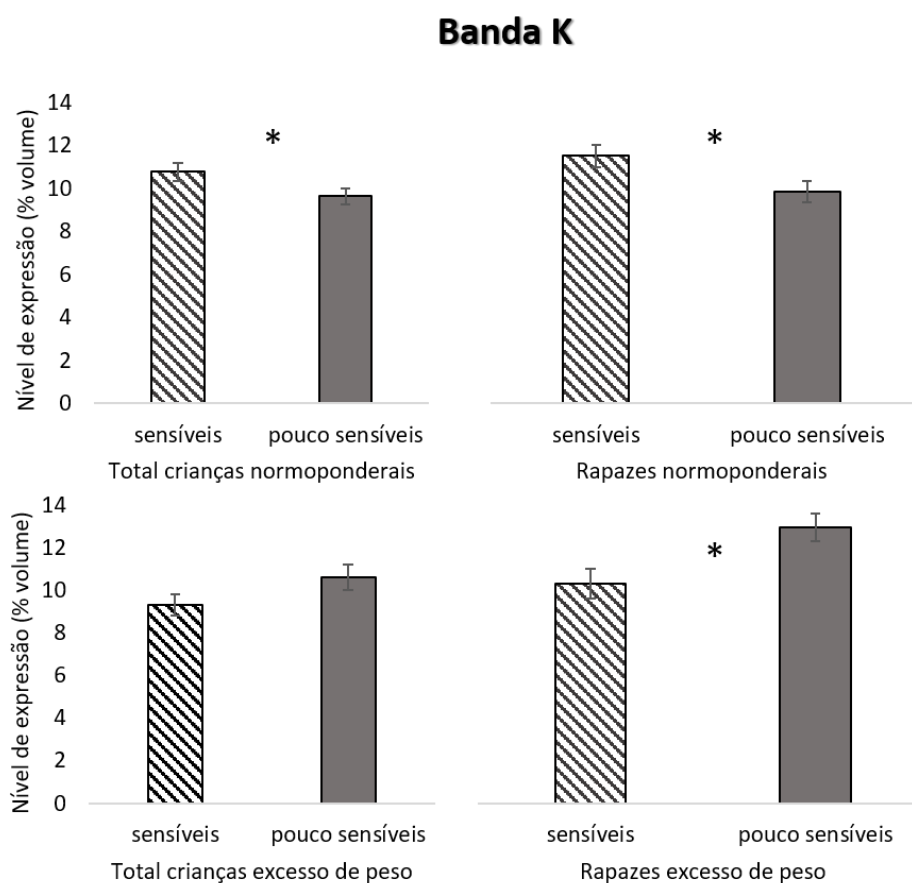


Figura 7.2- Nível de expressão da banda k, identificada como cistatina SN e cistatina S, entre crianças com diferentes limiares de deteção para a cafeína. (Média ± Erro padrão; *diferenças são estatisticamente significativas para $P < 0,05$).

Foram também observadas diferenças significativas nos níveis de expressão de outras bandas, mas só em crianças com excesso de peso (tabela 7.5).

Tabela 7.5- Bandas diferencialmente expressas entre diferentes grupos de sensibilidade para o gosto amargo em crianças pré-obesas e obesas.

% Volume (média ± erro padrão)

Banda	MW estimada (kDa)	Crianças pré-obesas			Crianças obesas		
		sensíveis	Pouco sensíveis	P	sensíveis	Pouco sensíveis	P
Raparigas							
A	167,1	3,15±0,13	2,63±0,18	0,039	2,77±0,13	2,88±0,34	0,73

7.3.1.2.2- Perfil unidimensional (SDS-PAGE) entre grupos de sensibilidade para o gosto doce

No que diz respeito a o gosto doce, não se observaram diferenças nos perfis proteicos, entre grupos de sensibilidade, nem considerando o total de crianças, nem considerando apenas as crianças normoponderais. No entanto, olhando apenas para as crianças pré-obesas ou obesas observaram-se diferenças nos níveis de expressão de algumas bandas proteicas (Tabela 7.6, figura 7.3).

Tabela 7.6- Bandas diferencialmente expressas entre diferentes grupos de sensibilidade para o gosto doce em crianças pré-obesas e obesas.

% Volume (média ± erro padrão)

Banda	MW estimada (kDa)	Crianças pré-obesas			Crianças obesas		
		sensíveis	Pouco sensíveis	P	sensíveis	Pouco sensíveis	P
Total crianças (rapazes + raparigas)							
F	54,2	9,43±0,73	11,46±0,56	0,045	11,92±1,74	10,22±0,63	0,375

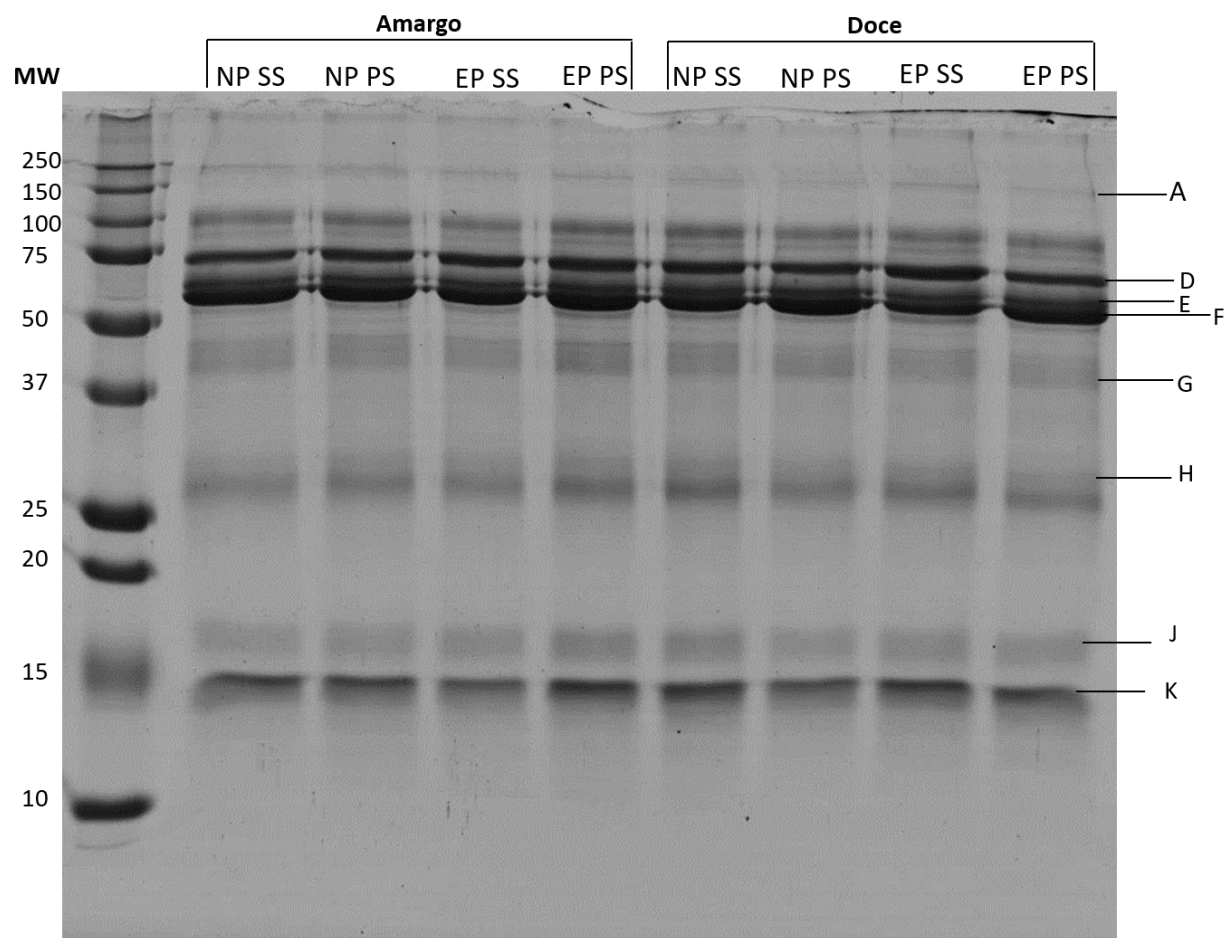


Figura 7.3- Imagem representativa de perfil unidimensional salivar (SDS-PAGE) de amostras de crianças. Cada *lane* corresponde a um *pool* de amostras de crianças. As letras correspondem às bandas diferencialmente expressas entre grupos de sensibilidade e entre grupos de diferente percentil IMC. MW- marcador de massa molecular (kDa). NP- Normoponderais; SS-sensíveis; PS-pouco sensíveis.

7.3.1.3. Perfil proteico bidimensional (2-DE)

7.3.1.3.1. Comparação do perfil proteico salivar de rapazes e raparigas

Comparando os perfis proteicos bi-dimensionais dos *pools* entre rapazes e raparigas, independentemente da perceção gustativa, observaram-se 13 *spots* proteicos diferencialmente expressos entre os dois sexos de crianças normoponderais, e 12 *spots* proteicos diferencialmente expressos entre os dois sexos de crianças com obesidade (Tabela 7.7).

Para as crianças normoponderais, os *spots* diferencialmente expressos entre sexos correspondem às proteínas região C da cadeia K de imunoglobulina (*spots* 9 e 27), actina citoplásmica 2 (*spot* 53), PIP (*spot* 40), inibidor de elastase de leucócito (*spot* 54), recetor polimérico de imunoglobulina (*spot* 81), CA-VI (*spots* 82 e 84) e α -amilase (*spots* 16, 17,97). Destes, apenas uma isoforma de α -amilase (*spot* 17) e um *spot* não identificado (*spot* 30) apresentaram expressão significativamente mais elevada em rapazes, encontrando-se as restantes aumentadas em raparigas (figura 7.4).

Tendo em consideração crianças com obesidade, os *spots* diferencialmente expressos entre sexos correspondem às proteínas cistatina-S (*spot* 0), α -amilase (*spots* 16 e 32), região C da cadeia K de imunoglobulina (*spot* 31), zinco α -2 glicoproteína (*spot* 50), recetor polimérico de imunoglobulina (*spot* 80), CA-VI (*spots* 82 e 84). Foram também observados 4 *spots* não identificados (*spots* 7, 30, 74, 96). Apenas o *spot* correspondente à proteína cistatina-S (*spot* 0), o *spot* correspondente a uma isoforma de α -amilase (*spot* 16) e 3 *spots* não identificados (*spots* 7, 74 e 96) apresentaram expressão significativamente mais elevada em rapazes, encontrando-se os restantes aumentados em raparigas (figura 7.4).

Tabela 7.7 - Identificação por espectrometria de massa das proteínas diferencialmente expressas entre rapazes e raparigas

Spot	Proteína	Referência de entrada Uniprot	MW (kDa) Estimado/teórico	PI Estimado/teórico	Score de identificação	Cobertura de sequência (%)	Nº peptídeos matches	% Volume (média ± erro padrão)			
								Rapazes	Raparigas	P	r
Normoponderais											
9	Região C cadeia K de imunoglobulina	P01834	24,8/11,6	7,2/5,6	331	82	13	0,42±0,05	0,89±0,12	0,006	0,47
16	α-amilase	P04745	55,8/57,7	6,0/6,3	1400	57	45	7,22±0,82	9,98±1,00	0,044	0,72
17	α-amilase	P04745	55,8/57,7	5,9/6,3	1570	65	50	2,69±0,31	1,46±0,19	0,004	1,84
27	Região C cadeia K de imunoglobulina	P01834	24,9/11,6	6,0/5,6	393	82	11	0,24±0,04	0,74±0,13	0,003	0,32
30	n.i.	-	30,4/-	6,3/-	-	-	-	0,71±0,01	0,12±0,01	0,005	6,14
40	Proteína induzida por prolactina	P12273	15,7/16,6	5/5,4	461	55	16	0,56±0,09	0,87±0,12	0,047	0,64
53	Actina citoplasmica 2	P63261	43,0/41,8	5,3/5,3	626	49	27	0,15±0,02	0,27±0,04	0,009	0,54
54	Inibidor de elastase de leucócito	P30740	41,1/42,7	5,8/5,9	760	40	26	0,12±0,02	0,16±0,01	0,046	0,71
60	n.i.	-	29,3/-	6,4/-	-	-	-	0,13±0,02	0,32±0,07	0,002	0,40

81	Receptor polimerico de imunoglobulina	P01833	80,4/83,2	5,6/5,6	970	39	48	0,58±0,05	0,83±0,11	0,049	0,70
82	CA-VI	P23280	38,2/35,3	6,0/6,4	709	47	27	0,12±0,02	0,31±0,05	0,004	0,40
84	CA-VI	P23280	38,8/35,3	5,9/6,4	540	44	26	0,23±0,04	0,64±0,08	0,001	0,36
97	α-amilase	P04745	62,6/57,7	5,4/6,3	1470	60	47	0,13±0,02	0,38±0,08	0,014	0,34
Obesos											
0	Cistatina-S	P01036	12,9/16,2	4,8/4,8	773	73	26	7,46±1,15	4,58±0,31	0,032	1,63
7	n.i	-	41,1/-	6,3/-	-	-	-	0,07±0,01	0,03±0,01	0,049	1,94
16	α-amilase	P04745	55,8/57,7	6,0/6,3	1400	57	45	14,32±1,94	9,41±0,85	0,030	1,52
30	n.i.	-	30,1/-	6,3/-	-	-	-	0,06±0,01	0,09±0,01	0,029	0,66
31	Região C da cadeia K imunoglobulina	P01834	24,9/11,6	5,9/5,6	453	82	13	0,17±0,02	0,39±0,67	0,007	0,44
32	α-amilase	P04745	27,2/57,7	5,9/6,3	809	54	40	0,19±0,03	0,34±0,05	0,013	0,56
50	Zinco α-2 glicoproteína	P25311	41,1/34,2	5,4/5,6	738	58	42	0,29±0,06	0,54±0,09	0,042	0,54
74	n.i	-	66,9/-	5,7/-	-	-	-	0,99±0,19	0,49±0,12	0,039	2,02

80	Receptor polimérico de imunoglobulina	P01833	82,2/83,2	5,6/5,6	852	38	47	0,28±0,03	0,45±0,06	0,009	0,62
82	CA-VI	P23280	38,2/35,3	6,0/6,4	709	47	27	0,11±0,02	0,29±0,04	0,0005	0,38
84	CA-VI	P23280	38,8/35,3	5,9/6,4	540	44	26	0,12±0,02	0,60±0,06	0,0005	0,20
96	n.i	-	41,6/-	6,0/-	-	-	-	10,06±1,85	5,06±0,93	0,028	1,99

MW- massas moleculares (kDa); r- rácio entre o volume dos spots nos rapazes e o volume do spot nas raparigas. As médias são consideradas diferentes quando o valor de $P < 0,05$ ou se o rácio é superior a 2 ou inferior a 0,5, independentemente do valor de P.

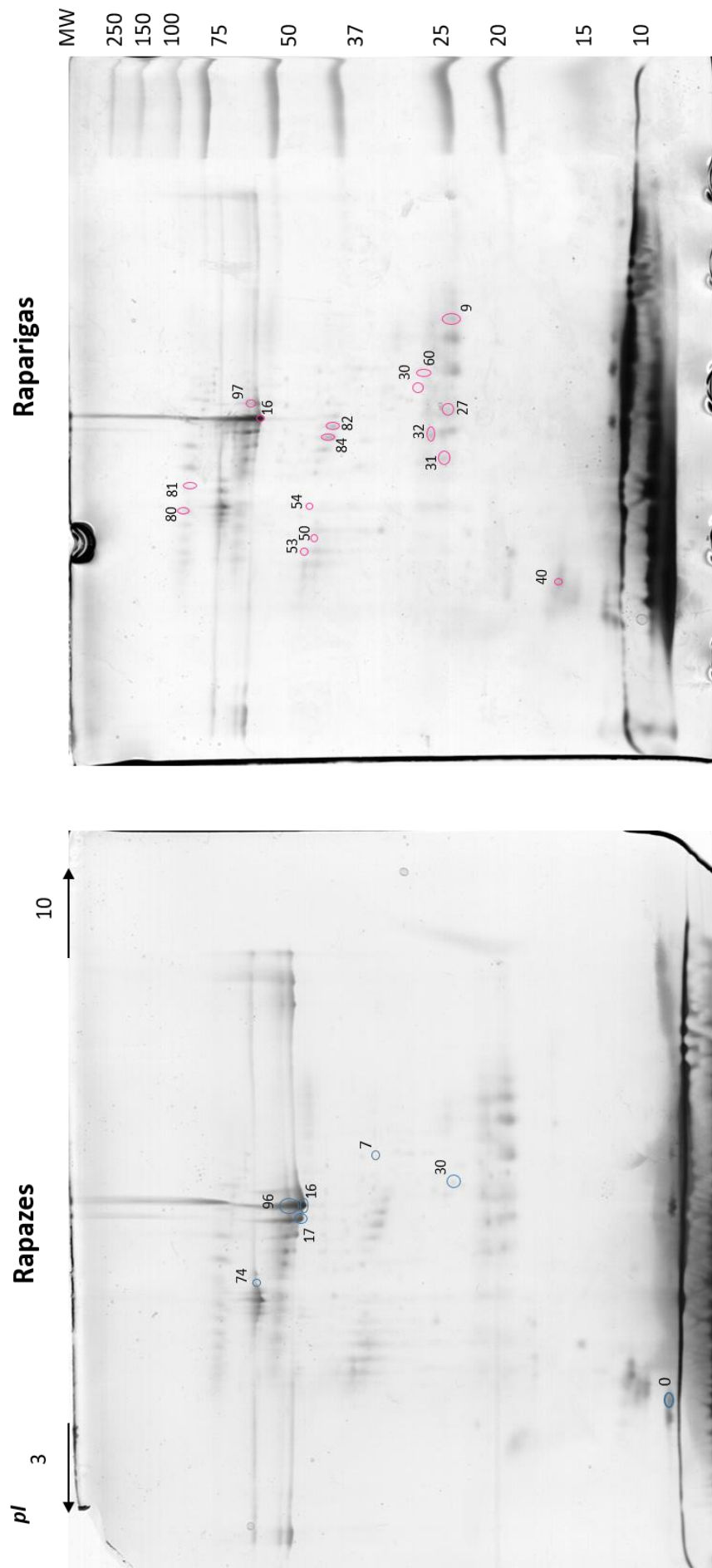


Figura 7.4– Imagens representativas do perfil proteico salivar bidimensional de rapazes e raparigas. No primeiro perfil encontram-se representados os spots com expressão mais elevada em rapazes, comparativamente a raparigas; no segundo perfil encontra-se representado o spot com expressão mais elevada em raparigas, comparativamente a rapazes. MW – massas moleculares (kDa); pI – ponto isoeletrico.

7.3.1.3.2. Comparação do perfil proteico entre crianças com diferente percentil IMC

A análise de diferenças entre crianças com diferente percentil de IMC, resultou em 9 *spots* diferencialmente expressos entre crianças normoponderais e crianças com obesidade tendo em conta o total de crianças, 6 *spots* diferencialmente expressos tendo em conta apenas rapazes e 9 *spots* diferencialmente expressos tendo em conta apenas raparigas (tabela 7.8). Estes *spots* correspondem às proteínas região C da cadeia K de imunoglobulina (*spot* 27), zinco α -2 glicoproteína (*spot* 50), PIP (*spot* 43), cistatina-s (*spot* 0), α -amilase (*spots* 16, 32 e 97), região C da cadeia λ -6 de imunoglobulina (*spot* 64) e lipocalina 1 (*spot* 38). Os *spots* 58 e 30 não foram identificados por espectrometria de massa (tabela 7.8).

As proteínas região C da cadeia K de imunoglobulina, região C da cadeia λ -6 de imunoglobulina e PIP apresentaram expressão significativamente mais elevada em crianças normoponderais, tendo em conta o total de crianças e em rapazes e raparigas separadamente. Por outro lado, a proteína zinco α -2 glicoproteína apresentou expressão mais elevada em crianças com excesso de peso, tendo em conta o total de crianças e em rapazes e raparigas separadamente. A proteína cistatina S também apresentou expressão mais elevada em crianças com excesso de peso, mas apenas em rapazes. A proteína α -amilase apresentou uma expressão diferencial entre grupos de percentil de IMC tendo em conta apenas rapazes e o total de crianças, estando um isoforma (*spot* 32) com expressão aumentada em normoponderais e duas (*spots* 16 e 97) com expressão aumentada em crianças com excesso de peso. Por fim, a proteína lipocalina (*spot* 38) apresentou expressão significativamente mais elevada em crianças normoponderais, mas apenas tendo em conta o total de crianças (tabela 7.8).

Tabela 7.8- Identificação por espectrometria de massa das proteínas diferencialmente expressas entre crianças normoponderais e obesas

Spot	Proteína	Ref. de entrada Uniprot	MW (kDa) Estimado/teórico	PI Estimado/teórico	Score ID	Seq (%)	Nº PM	% Volume (média ± erro padrão)											
								Total crianças				Rapazes				Raparigas			
								NP	Ob	P	r	NP	Ob	P	r	NP	Ob	P	r
0	Cistatina-S	P01036	12,9/16,2	4,8/4,8	773	73	26	3,58±0,43	4,55±0,29	0,09	0,91	4,68±0,64	7,46±0,07	0,038	0,63	3,97±0,72	4,58±0,31	0,443	0,87
3	n.i.	-	43,06/-	8,5/-	-	-	-	0,19±0,04	0,09±0,02	0,068	2,29	---	---	---	---	0,21±0,04	0,07±0,02	0,071	2,88
♦15	n.i	-	36,3/-	6,0/-	-	-	-	0,93±0,13	0,73±0,08	0,186	1,26	0,78±0,21	0,68±0,09	0,691	1,14	1,40±0,13	0,78±0,14	0,046	1,78
16	α-amilase	P04745	55,8/57,7	6,0/6,3	1400	57	45	8,60±0,69	11,87±1,16	0,020	0,72	7,22±0,82	14,32±1,94	0,004	0,50	9,98±1,00	9,41±0,85	0,671	1,06
20	n.i	-	41,6/-	6,1/-	-	-	-	0,09±0,02	0,11±0,03	0,498	0,79	0,04±0,01	0,12±0,03	0,090	0,30	---	---	---	---
27	Região C cadeia K de imunoglob ulina	P01834	24,9/11,6	6,0/5,6	393	82	11	0,55±0,10	0,21±0,02	0,020	2,61	0,24±0,04	0,18±0,05	0,325	1,34	0,74±0,13	0,22±0,03	0,002	3,34
30	n.i.	-	30,1/-	6,3/-	-	-	-	0,10±0,12	0,08±0,01	0,037	1,37	0,07±0,01	0,06±0,01	0,247	1,20	0,17±0,03	0,09±0,01	0,029	1,92

32	α -amilase	P04745	27,2/57,7	7,5/6,3	809	54	40	0,38 \pm 0,04	0,27 \pm 0,03	0,027	1,40	0,36 \pm 0,05	0,19 \pm 0,03	0,007	1,87	0,39 \pm 0,53	0,34 \pm 0,05	0,503	1,14
38	Lipocalina 1	P31025	14,8/19,2	4,9/5,2	297	63	19	0,44 \pm 0,07	0,25 \pm 0,04	0,028	1,77	0,42 \pm 0,10	---	---	---	0,33 \pm 0,03	0,26 \pm 0,04	0,266	1,27
43	Proteína induzida por prolactina	P12273	16,4/16,6	4,8/5,4	438	63	18	0,62 \pm 0,11	0,34 \pm 0,05	0,039	1,82	0,48 \pm 0,15	0,30 \pm 0,12	0,470	1,60	0,78 \pm 0,14	0,36 \pm 0,06	0,010	2,19
50	Zinco α -2 glicoproteí na	P25311	41,4/34,2	5,4/5,6	738	58	42	0,17 \pm 0,02	0,42 \pm 0,06	0,001	0,40	0,12 \pm 0,02	0,30 \pm 0,06	0,004	0,41	0,23 \pm 0,04	0,54 \pm 0,09	0,009	0,43
58	n.i.	-	54,7/-	5,5/-	-	-	-	0,17 \pm 0,02	0,13 \pm 0,03	0,096	1,31	0,18 \pm 0,03	0,26 \pm 0,07	0,211	0,67	0,17 \pm 0,02	0,08 \pm 0,02	0,007	2,10
64	Região C da cadeia λ -6 de imunoglob ulina	P0CF74	27,2/11,3	7,3/7,2	186	39	5	0,38 \pm 0,03	0,17 \pm 0,02	0,005	2,18	0,39 \pm 0,04	0,17 \pm 0,04	0,002	2,29	0,42 \pm 0,05	0,18 \pm 0,03	0,048	2,38
97	α -amilase	P04745	62,6/57,7	5,4/6,3	1470	60	47	0,23 \pm 0,04	0,21 \pm 0,04	0,750	1,13	0,17 \pm 0,03	0,24 \pm 0,06	0,165	0,75	0,31 \pm 0,03	0,15 \pm 0,03	0,079	2,01

n.i.- não identificado; MW-massas moleculares (kDa); (---) valores em falta devido a N insuficiente; (-) valores em falta devido a não identificação; NP- normoponderais; Ob-obesos; \blacklozenge - Apesar do spot não estar identificado, pela sua posição no gel, provavelmente, será uma α -amilase salivar; r- rácio entre o volume dos spots nas crianças normoponderais e o volume do spot nas crianças obesas. As médias são consideradas diferentes quando o valor de $P < 0,05$ ou se o rácio é superior a 2 ou inferior a 0,5, independentemente do valor de P; Score ID – Score de identificação da proteína; Seq (%) – cobertura de sequência; Nº PM – nº de péptidos *matched*.

7.3.1.3.3- Comparação do perfil proteico entre grupos com diferente sensibilidade para o gosto amargo

Os resultados obtidos mostraram a existência de diferenças entre os grupos sensíveis e pouco sensíveis ao gosto amargo, nos níveis de expressão de 19 *spots* proteicos (tabela 7.9, figura 7.5). Destes, 7 apresentaram diferenças estatisticamente significativas apenas em rapazes e 12 apenas em raparigas.

Dezasseis dos 19 *spots* diferencialmente expressos entre grupos de diferente sensibilidade para o amargo foram identificados com sucesso por espectrometria de massa. A informação relativa aos detalhes das identificações encontra-se na Tabela 7.9.

Os *spots* identificados que diferem entre grupos de sensibilidade para o gosto amargo correspondem a diversas proteínas, nomeadamente região C da cadeia K de imunoglobulinas, albumina, proteína induzida por prolactina (PIP), α -amilase, recetor polimérico de imunoglobulina, CA-VI e inibidor de elastase de leucócito.

Tendo em conta o total de rapazes, as proteínas PIP (*spot* 35), inibidor de elastase de leucócitos (*spot* 54) e recetor polimerico de imunoglobulina (*spots* 77 e 78) apresentaram níveis de expressão significativamente mais elevados em rapazes pouco sensíveis ao gosto amargo, comparativamente a sensíveis. A proteína CA-VI (*spot* 83) apresentou expressão significativamente mais elevada em rapazes pouco sensíveis ao amargo, comparativamente a sensíveis, e a proteína albumina (*spot* 76) apresentou níveis mais elevados em sensíveis, comparativamente a pouco sensíveis, mas só no caso dos normoponderais. Por fim, a proteína actina citoplásmica 2 (*spot* 53) foi observada como estando diferencialmente expressa apenas em rapazes obesos, estando significativamente mais elevada no grupo de rapazes pouco sensíveis, comparativamente a rapazes sensíveis.

As proteínas CA-VI (*spot* 84) e recetor polimérico de imunoglobulina (*spots* 81 e 22), considerando o total de raparigas, apresentaram expressão significativamente mais elevada em sensíveis. Já as proteínas α -amilase salivar (*spot* 59), região C da cadeia K de imunoglobulina (*spots* 27, 31 e 62) e PIP (*spot* 40) apresentaram níveis de expressão mais elevados em raparigas pouco sensíveis para o amargo. Por fim, a proteína albumina (*spot* 89) foi observada como estando diferencialmente expressa, entre grupos de sensibilidade para o amargo, tanto em raparigas normoponderais como em raparigas obesas, mas em sentido oposto: mais elevada em raparigas sensíveis, no

caso das raparigas normoponderais e mais elevada em pouco sensíveis, no caso das raparigas obesas.

Tabela 7.9- Identificação por espectrometria de massa das proteínas diferencialmente expressas entre crianças sensíveis e pouco sensíveis ao amargo

Spot	Proteína	Ref. de entrada <i>Uniprot</i>	MW (kDa) Estimado/ teórico	PI Estimado/ teórico	Score ID	Seq (%)	Nº PM	% Volume (média ± erro padrão)														
								Total						Normoponderais						Obesos		
								Sensíveis	Pouco sensíveis	P	r	Sensíveis	Pouco sensíveis	P	r	Sensíveis	Pouco sensíveis	P	r			
Rapazes																						
35	Proteína induzida por prolactina	P12273	15,7/16,6	5,2/5,4	264	55	13	0,35±0,06	0,59±0,06	0,013	0,59	0,34±0,09	0,62±0,09	0,052	0,55	0,37±0,11	0,56±0,80	0,149	0,65			
53	Actina citoplasmática 2	P63261	43,0/41,8	5,3/5,3	626	49	27	0,17±0,01	0,19±0,03	0,559	0,89	0,16±0,02	0,14±0,03	0,488	1,15	0,18±0,00	0,27±0,02	0,05	0,66			
54	Elastase inibidor de leucócito	P30740	41,4/42,7	5,8/5,9	760	40	26	0,10±0,01	0,15±0,020	0,048	0,69	0,09±0,02	0,17±0,03	0,030	0,54	0,11±0,01	0,14±0,03	0,507	0,83			
76	Albumina	P02768	47,7/69,3	5,5/5,7	1010	47	49	3,14±0,39	1,77±0,35	0,016	1,78	2,77±0,51	0,79±0,15	0,008	3,52	3,02±0,41	2,04±0,44	0,143	1,48			
77	Receptor polimérico de imunoglobulina	P01833	62,6/83,2	5,5/5,6	1120	43	52	0,26±0,03	0,44±0,04	0,002	0,59	0,24±0,02	0,49±0,07	0,013	0,49	0,26±0,05	0,36±0,14	0,125	0,72			
78	Receptor polimérico de imunoglobulina	P01833	62,6/83,2	5,5/5,6	915	43	52	0,26±0,03	0,41±0,04	0,008	0,63	0,29±0,05	0,45±0,02	0,039	0,66	0,21±0,04	0,41±0,07	0,046	0,51			
83	CA-VI	P23280	38,8/35,3	5,9/6,4	618	47	32	0,37±0,06	0,63±0,12	0,056	0,58	0,34±0,02	0,77±0,18	0,019	0,44	0,36±0,09	0,49±0,14	0,490	0,75			

Raparigas																			
♦18	n.i	-	40,2/-	5,9/-	-	-	-	0,93±0,08	1,49±0,18	0,030	0,62	0,85±0,11	1,37±0,24	0,093	0,43	1,56±0,53	1,36±0,19	0,831	1,15
22	Receptor polimérico de imunoglobulina	P01833	60,5/83,2	6,0/5,6	33	41	956	0,23±0,05	0,14±0,03	0,148	2,19	0,30±0,09	0,11±0,02	0,034	2,66	0,17±0,06	0,16±0,05	0,909	1,06
27	Região C da cadeia K de imunoglobulina	P01834	24,9/11,6	6,0/5,6	82	11	393	0,22±0,03	0,66±0,14	0,014	0,37	0,50±0,18	0,95±0,15	0,078	0,53	0,22±0,04	0,23±0,05	0,782	0,93
31	Região C da cadeia K de imunoglobulina	P01834	24,9/11,6	5,9/5,6	82	13	453	0,23±0,04	0,43±0,07	0,015	0,53	0,19±0,06	0,34±0,06	0,117	0,57	0,27±0,03	0,53±0,11	0,068	0,50
40	Proteína induzida por prolactina	P12273	15,7/16,6	5,0/5,4	55	16	461	0,48±0,04	0,95±0,14	0,014	0,51	0,53±0,71	1,16±0,03	0,025	0,46	0,44±0,04	0,66±0,29	0,521	0,67
59	α-amilase	P04745	27,2/57,7	6,4/6,3	46	29	372	0,14±0,01	0,25±0,03	0,009	0,55	0,14±0,01	0,24±0,05	0,189	0,59	0,15±0,01	0,27±0,05	0,069	0,58
62	Região C da cadeia K de imunoglobulina	P01834	25,2/11,6	7,3/5,6	83	13	318	0,93±0,15	1,86±0,29	0,012	0,49	0,81±0,03	1,83±0,19	0,003	0,44	0,87±0,25	1,90±0,58	0,151	0,46
81	Receptor polimérico de imunoglobulina	P01833	80,4/83,2	5,6/5,6	39	48	979	0,77±0,08	0,56±0,55	0,051	1,37	0,85±0,16	0,67±0,08	0,376	1,26	0,70±0,06	0,47±0,05	0,016	1,47
84	CA-VI	P23280	38,8/35,3	5,9/6,4	44	26	540	0,81±0,02	0,51±0,054	0,0005	1,59	0,72±0,13	0,56±0,09	0,363	1,29	0,79±0,02	0,47±0,02	0,014	1,67
89	Albumina	P02768	47,7/69,3	5,5/5,7	54	62	1040	0,60±0,15	0,64±0,09	0,821	0,94	1,17±0,10	0,57±0,21	0,034	2,06	0,29±0,10	0,67±0,09	0,020	0,44
96	n.i	-	41,6/-	6,0/-	-	-	-	7,20±0,92	4,09±0,66	0,011	1,76	7,43±0,16	5,08±0,36	0,194	1,46	7,05±1,25	3,07±0,81	0,023	2,29

234	n.i	-	60,5/-	5,9/-	-	-	-	0,48±0,07	0,20±0,04	0,002	2,46	0,44±0,10	0,17±0,05	0,070	2,55	0,52±0,11	0,26±0,03	0,033	2,00
-----	-----	---	--------	-------	---	---	---	-----------	-----------	-------	------	-----------	-----------	-------	------	-----------	-----------	-------	------

MW – massas moleculares (kDa); *pI* – ponto isoelétrico; (-) valores em falta por insucesso na identificação; ♦ – Apesar do spot não estar identificado, pela sua posição no gel, provavelmente, será uma α -amilase salivar. *r* - rácio entre o volume dos spots nas crianças sensíveis e o volume do spot nas crianças pouco sensíveis. As médias são consideradas diferentes quando o valor de $P < 0,05$ ou se o rácio é superior a 2 ou inferior a 0,5, independentemente do valor de *P*.

7.3.1.3.4- Comparação do perfil proteico entre grupos com diferente sensibilidade para o gosto doce

Os resultados obtidos mostram a existência de diferenças entre os grupos sensíveis e pouco sensíveis para o gosto doce nos níveis de expressão de 16 *spots* proteicos (tabela 7.10, figura 7.5). Destes, 6 apresentaram diferenças estatisticamente significativas apenas em rapazes e 7 apenas em raparigas. 3 *spots* apresentam diferenças entre grupos de sensibilidade em rapazes e raparigas, simultaneamente.

Quatorze dos 16 *spots* diferencialmente expressos entre grupos de diferente sensibilidade para o doce foram identificados com sucesso por espectrometria de massa. A informação relativa aos detalhes das identificações encontra-se na Tabela 7.10.

Os *spots* identificados que diferem entre grupos de sensibilidade para o gosto doce correspondem a diversas proteínas, nomeadamente cistatinas, zinco α -2 glicoproteína, região C da cadeia K de imunoglobulinas, actina citoplásmica 1, albumina, proteína induzida por prolactina (PIP), α -amilase e recetor polimérico de imunoglobulina.

Considerando o total de rapazes, a proteína PIP (*spot* 37) apresentou expressão significativamente mais elevada em rapazes pouco sensíveis, comparativamente a rapazes sensíveis. Ainda neste grupo, a proteína CA-VI (*spot* 84), apresentou uma expressão significativamente mais elevada em rapazes sensíveis, comparativamente a rapazes pouco sensíveis.

Considerando apenas os rapazes normoponderais, as proteínas α -amilase salivar (*spot* 16), PIP (*spot* 37), cistatina-SN (*spot* 100), albumina (*spots* 75) e lipocalina 1 (*spot* 38) apresentaram expressão significativamente mais elevada em rapazes pouco sensíveis ao doce, comparativamente a rapazes sensíveis a este gosto.

Tendo em consideração o total de raparigas, a proteínas α -amilase salivar (*spot* 16) apresentou expressão significativamente mais elevada em raparigas pouco sensíveis ao gosto doce, comparativamente a sensíveis. Por outro lado, a proteína albumina (*spot* 75) apresentou expressão significativamente mais elevada em raparigas sensíveis ao doce, comparativamente a pouco sensíveis.

Considerando apenas raparigas normoponderais, as proteínas região C da cadeia K de imunoglobulina (*spot* 61), recetor polimérico de imunoglobulina (*spot* 22),

actina citoplasmica 1 (*spot* 52) e PIP (*spot* 37), apresentaram expressão significativamente mais elevada em raparigas sensíveis ao doce, comparativamente a pouco sensíveis. Por outro lado, as proteínas α -amilase salivar (*spot* 29 e 97) e cistatina (*spot* 0) apresentaram expressão significativamente mais elevada em raparigas pouco sensíveis ao doce, comparativamente a sensíveis.

Tabela 7.10- Identificação por espectrometria de massa das proteínas diferencialmente expressas entre crianças sensíveis e pouco sensíveis ao doce

Spot	Proteína	Ref. de entrada Uniprot	MW (kDa) Estimado/teórico	PI Estimado/teórico	Score ID	Seq (%)	Nº PM	% Volume (média ± erro padrão)														
								Total						Normoponderais						Obesos		
								Sensíveis	Pouco sensíveis	P	r	Sensíveis	Pouco sensíveis	P	r	Sensíveis	Pouco sensíveis	r	P	r		
Rapazes																						
16	α-amilase	P04745	55,8/57,7	6,0/6,3	1400	57	45	10,25±2,36	11,28±1,15	0,204	0,90	5,23±0,51	9,17±1,09	0,009	0,57	15,24±3,66	13,39±1,70	0,657	1,14			
18	n.i	-	40,2/-	5,9/-	-	-	-	2,03±0,27	1,24±0,15	0,019	1,64	2,05±0,53	1,23±0,17	0,202	1,60	0,64±0,10	0,72±0,16	0,714	0,90			
23	Albumina	P02768	41,1/69,3	5,5/5,7	383	35	29	0,28±0,06	0,15±0,03	0,157	1,86	0,28±0,08	0,09±0,15	0,062	3,11	0,28±0,86	0,25±0,16	0,770	1,11			
37	Proteína induzida por prolactina	P12273	14,8/16,6	5,0/5,4	271	71	13	0,21±0,03	0,62±0,13	0,022	0,34	0,20±0,05	0,68±0,14	0,014	0,29	---	---	---	---			
38	Lipocalina 1	P31025	14,8/19,2	4,9/5,2	297	63	19	0,23±0,09	0,44±0,12	0,354	0,52	0,23±0,089	0,510±0,13	0,228	0,45	---	---	---	---			
73	n.i	-	49,3/-	5,5/-	-	-	-	0,28±0,06	0,23±0,05	0,487	1,23	0,21±0,06	0,31±0,08	0,35	0,69	0,39±0,11	0,15±0,03	0,024	2,71			
75	Albumina	P02768	47,7/69,3	5,5/5,7	1240	57	58	0,74±0,12	0,89±0,09	0,099	0,83	0,48±0,02	0,89±0,15	0,050	0,54	0,92±0,20	0,86±0,11	0,868	1,04			
84	CA-VI	P23280	38,8/35,3	5,9/6,4	540	44	26	0,23±0,03	0,11±0,01	0,007	2,16	0,27±0,05	0,19±0,05	0,266	1,43	0,16±0,03	0,10±0,01	0,038	1,68			
100	Cistatina-SN	P01037	12,8/16,4	6,4/6,9	604	66	30	1,53±0,13	2,25±0,39	0,108	0,63	1,55±0,10	2,81±0,56	0,073	0,49	1,48±0,37	1,58±0,43	0,888	1,04			

Reparigas																			
0	Cistatina-S	P01036	12,9/16,2	4,8/4,8	773	73	26	3,44±0,58	4,40±0,29	0,322	0,78	2,35±0,78	4,43±0,35	0,046	0,53	4,76±0,41	4,37±0,53	0,573	1,09
16	α-amilase	P04745	55,8/57,7	6,0/6,3	1400	57	45	8,44±0,83	10,95±0,87	0,049	0,77	8,64±1,53	11,31±1,16	0,195	0,76	8,24±0,82	10,58±1,39	0,178	0,78
22	Receptor polimérico de imunoglobulina	P01833	60,5/83,2	6,0/5,6	956	33	41	0,25±0,04	0,09±0,02	0,002	2,86	0,26±0,08	0,11±0,03	0,199	2,25	0,249±0,03	0,07±0,03	0,014	3,67
29	α-amilase	P04745	27,2/57,7	6,0/6,3	641	47	40	0,46±0,05	0,21±0,21	0,0005	2,21	0,58±0,03	0,19±0,04	0,021	3,01	0,39±0,06	0,23±0,02	0,044	1,73
37	Proteína induzida por prolactina	P12273	14,8/16,6	5,0/5,4	271	71	13	0,60±0,12	0,19±0,03	0,008	3,15	0,42±0,11	0,12±0,01	0,064	3,62	0,75±0,18	0,22±0,01	0,014	3,47
48	Cistatina-A	P01040	19,3/11,0	5,3/5,4	143	86	11	0,54±0,11	0,90±0,17	0,080	0,60	0,27±0,01	0,77±0,20	0,019	0,35	0,61±0,10	1,04±0,27	0,203	0,59
52	Actina citoplásmica 2	P60709	43,0/41,7	5,1/5,3	580	55	29	0,28±0,02	0,15±0,02	0,0005	2,13	0,30±0,03	0,16±0,02	0,024	1,65	0,32±0,03	0,10±0,02	0,021	3,11
61	Região C da cadeia K de imunoglobulina	P01834	24,9/11,6	6,3/5,6	285	82	12	0,17±0,02	0,07±0,01	0,001	2,56	0,19±0,01	0,05±0,01	0,064	3,90	0,13±0,01	0,07±0,01	0,053	1,82
75	Albumina	P02768	47,7/69,3	5,5/5,7	1240	57	58	1,45±0,26	0,58±0,11	0,008	2,48	1,80±0,45	0,70±0,16	0,061	2,57	1,10±0,23	0,39±0,04	0,088	2,84
97	α-amilase	P04745	62,6/57,7	5,4/6,3	1470	60	47	0,16±0,02	0,47±0,12	0,048	0,34	0,17±0,03	0,47±0,12	0,071	0,37	---	---	---	---

MW – massas moleculares (kDa); pI – ponto isoelétrico; n.i.- não identificado; (---) valores em falta devido a N insuficiente; (-) valores em falta devido a não identificação; ◆ - Apesar do spot não estar identificado, pela sua posição no gel, provavelmente, será uma α-amilase salivar. r- rácio entre o volume dos spots nas crianças sensíveis e o volume do spot nas crianças pouco sensíveis. As médias são consideradas diferentes quando o valor de P<0,05 ou se o rácio é superior a 2 ou inferior a 0,5, independentemente do valor de P.

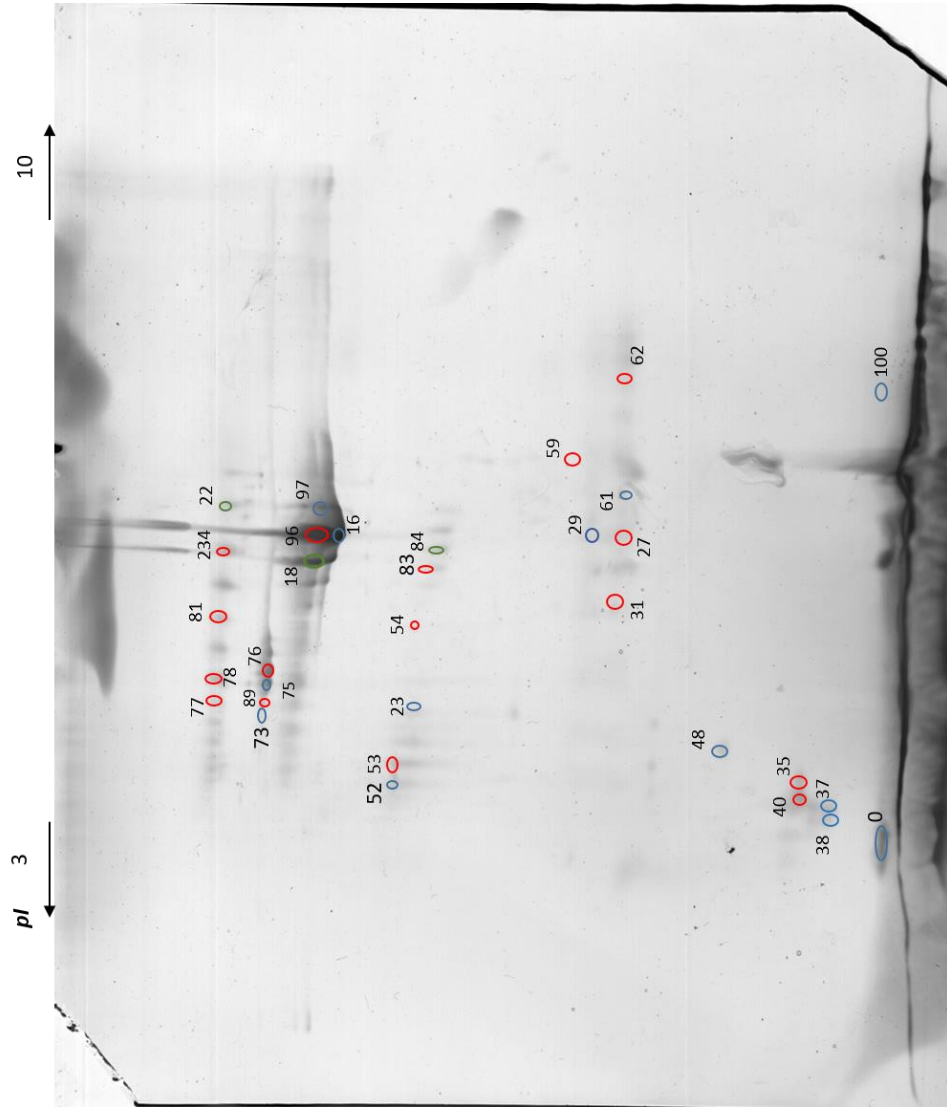


Figura 7.5– Imagem representativa do perfil proteico salivar bidimensional, com representação de spots diferencialmente expressos entre grupos de diferente sensibilidade gustativa para o amargo (spots a vermelho) e entre grupos de sensibilidade gustativa para o doce (spots a azul). spots marcados a verde – spots diferencialmente expressos entre grupos de sensibilidade para o amargo e para o doce. *pI* – ponto isoeletrico

7.3.1.4. Análise da banda K por nano LC-MS/MS

A análise, por LC-MS/MS, da banda K (figura 7.3) observada nos géis SDS-PAGE com massa molecular aparente de 13,6kDa, resultou na identificação de diferentes isoformas de cistatina e outras proteínas.

A tabela 7.11 resume as proteínas identificadas, e o respetivo código de acesso, para as que apresentaram expressão significativamente diferente entre crianças com diferente percentil de IMC e/ou entre crianças com diferente sensibilidade para os gostos doce e amargo.

7.3.1.4.1. Comparação da expressão das proteínas presentes na banda K entre crianças com diferente percentil de IMC

Os resultados obtidos mostraram diferenças significativas entre crianças normoponderais e com excesso de peso ao nível de sete proteínas que compõem a banda K: cistatina A, cistatina B, cistatina SA, profilina 1, PIP, proteína S-100 A-7 e Homologo B da proteína 16 de grânulo de zimogénio (tabela 7.11). Todas estas proteínas apresentaram expressão significativamente mais elevada em crianças com excesso de peso (figura 7.6).

Considerando a expressão por unidade de volume (ou seja, normalizando para a concentração proteica), além das diferenças referidas anteriormente, observou-se ainda uma tendência para as cistatinas C ($P=0,103$) e S ($P=0,115$) apresentarem também expressão mais elevada em crianças com excesso de peso (figura 7.7).

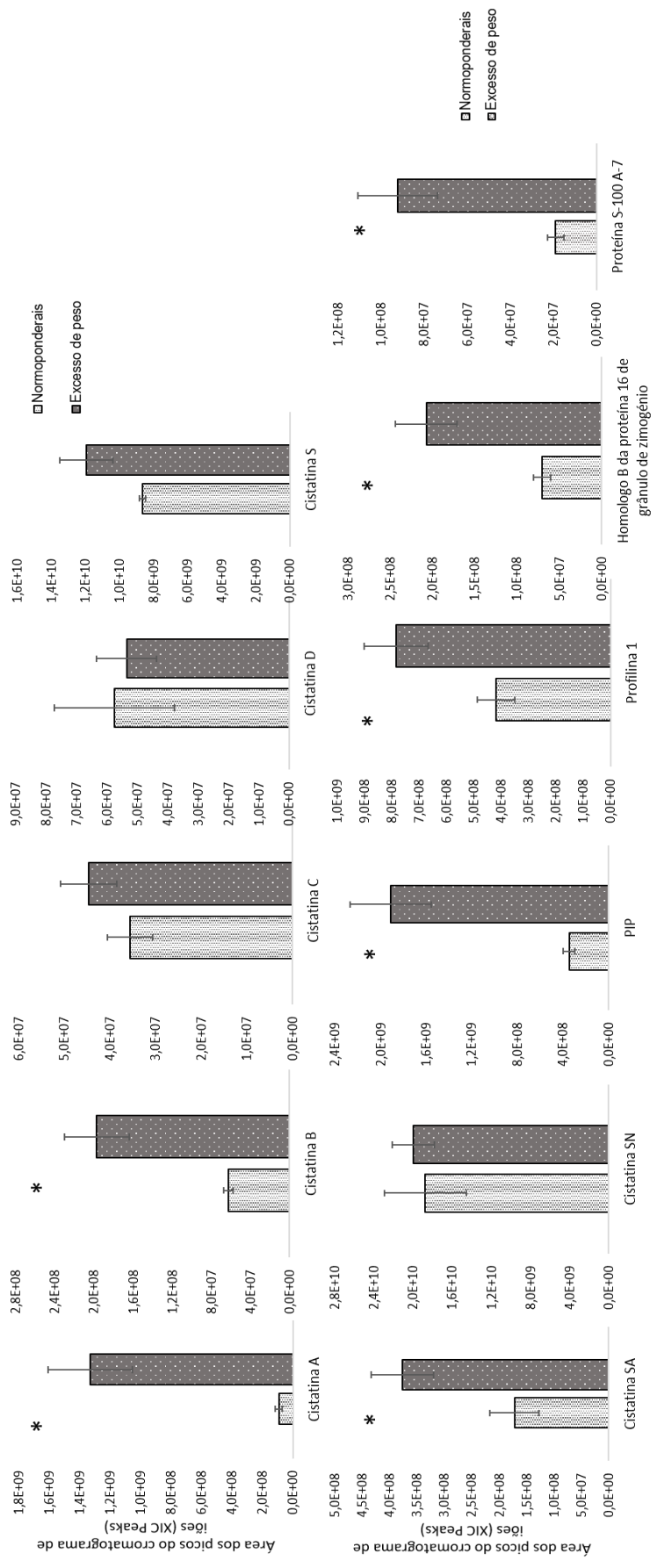


Figura 7.6- Nível de expressão das diferentes isoformas de cistatina e outras proteínas presentes na banda K₁ entre crianças normoponderais e com excesso de peso. * Indica as diferenças significativas para P<0,05.

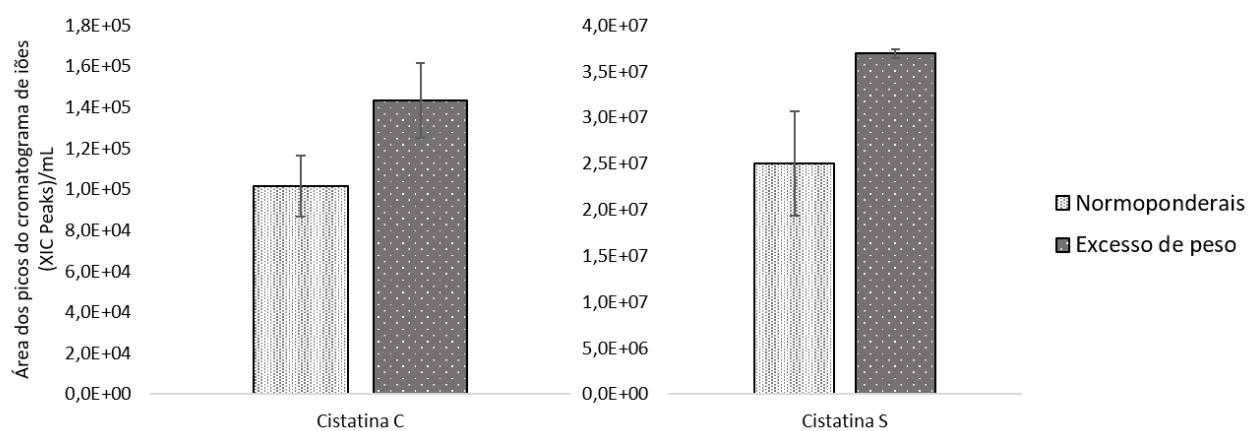


Figura 7.7- Nível de expressão, por unidade de volume de cistatina C e cistatina S, presentes na banda K, entre crianças com diferente percentil de IMC.

Tabela 7.11- Proteínas salivares presentes na banda K e identificadas por LC-MS/MS

Proteína	Referência de entrada <i>Uniprot</i>
Cistatina A	P01040
Cistatina B	P04080
Cistatina C	P01034
Cistatina S	P01036
Cistatina SA	P09228
Cistatina SN	P01037
Proteína induzida por prolactina (PIP)	P12273
Homologo B da proteína 16 de grânulo de zimogénio	Q96DA0
Profilina 1	P07737
Proteína S-100 A-7	P31151

7.3.1.4.2. Comparação da expressão das proteínas presentes na banda K entre crianças com diferente sensibilidade para o gosto amargo

Comparando os grupos de sensibilidade para o gosto amargo, no que diz respeito aos níveis de proteínas identificadas para a banda K (banda de massa molecular aparente de 13,6kDa), as diferenças a nível das cistatinas S, SN e SA foram apenas observadas para as crianças normoponderais, tendo estas apresentado níveis significativamente mais elevados no grupo de crianças sensíveis a este gosto, comparativamente a pouco sensíveis (figura 7.8). A cistatina A, pelo contrário, foi observada em níveis mais elevados nas crianças pouco sensíveis, mas também só no caso das normoponderais. Curiosamente, ao contrário do que acontece nas crianças normoponderais, e olhando apenas para aquelas com excesso de peso, esta proteína apresenta níveis mais elevados nas crianças sensíveis.

Se tivermos em conta os níveis de cada uma destas proteínas por unidade de volume de saliva (níveis normalizados para a concentração em proteína total), as diferenças observadas continuam a ser as mesmas. Apenas no caso da exceção da cistatina SA a diferença deixa de ser estatisticamente significativa, ainda que a tendência se mantenha (Figura 7.9).

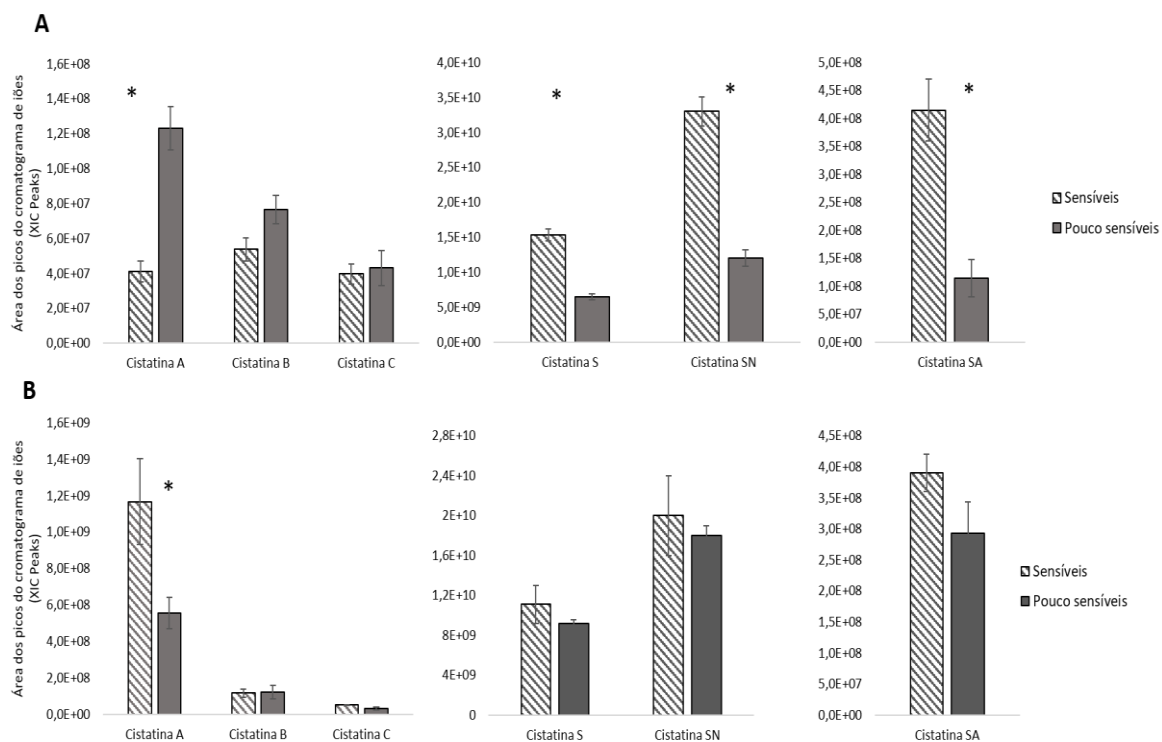


Figura 7.8- Nível de expressão das diferentes isoformas de cistatina, presentes na banda K, entre crianças **(A)** normoponderais e **(B)** com excesso de peso com diferente sensibilidade para o gosto amargo. * As diferenças são significativas para $P < 0,05$.

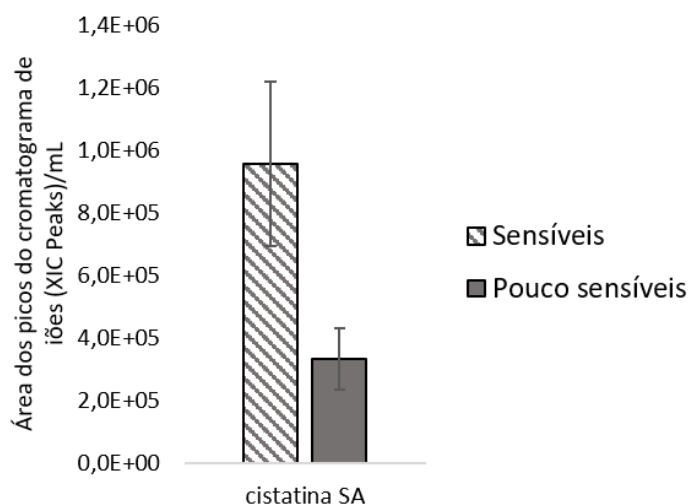


Figura 7.9- Nível de expressão, normalizado para a concentração proteica, de cistatina SA, presente na banda K, entre crianças normoponderais com diferente sensibilidade para o gosto amargo.

7.3.1.4.3. Comparação da expressão das proteínas presentes na banda K entre crianças com diferente sensibilidade para o gosto doce

Tendo em consideração o gosto doce, observou-se um aumento significativo da expressão das proteínas cistatinas S e SN no grupo de crianças normoponderais pouco sensíveis a este gosto, comparativamente a sensíveis (figura 7.10).

Considerando os níveis de cada uma destas proteínas por unidade de volume de saliva, além da proteína SN anteriormente referida, observaram-se também as proteínas cistatina A, S, PIP e profilina como estando significativamente mais elevadas em crianças pouco sensíveis ao gosto doce, comparativamente a sensíveis. A proteína cistatina SA, tendo em conta a expressão normalizada, não apresenta diferenças estatisticamente significativas entre grupos de sensibilidade para o doce (figura 7.11). Estas diferenças apenas se observaram para as crianças normoponderais.

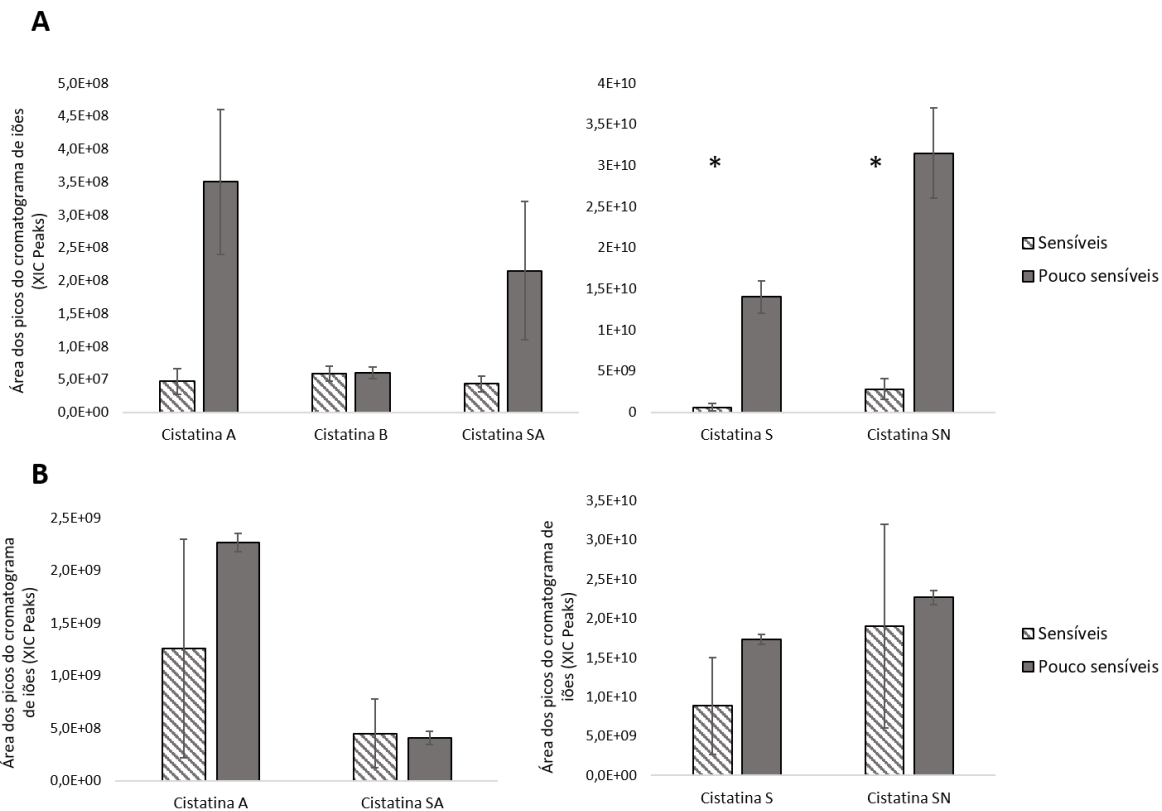


Figura 7.10- Nível de expressão das diferentes isoformas de cistatina, presentes na banda K, entre crianças (A) normoponderais e (B) obesas com diferente sensibilidade para o gosto doce.

* As diferenças são significativas para $P < 0,05$.

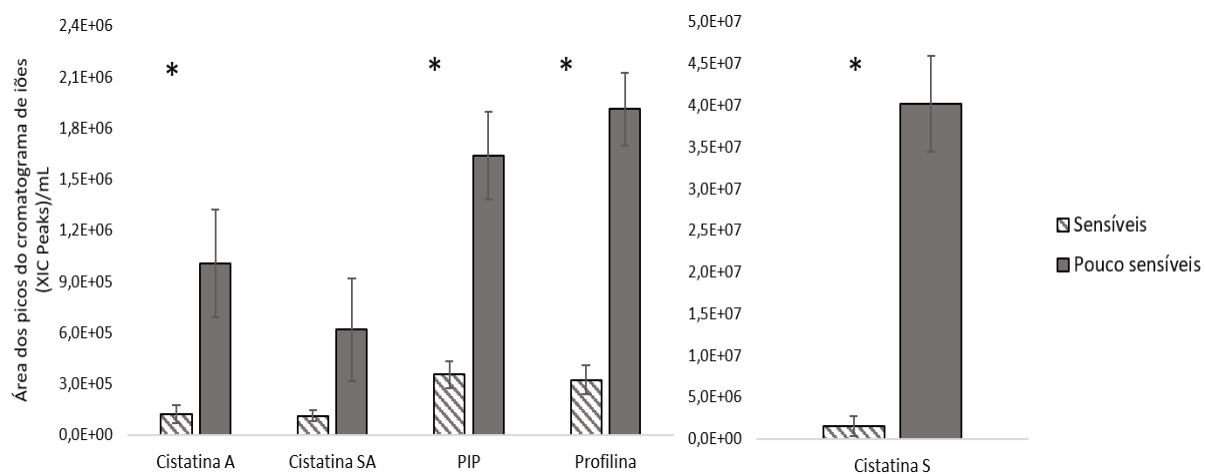


Figura 7.11- Níveis de cistatinas, por unidade de volume de saliva: comparação entre crianças normoponderais com diferente sensibilidade para o gosto doce. * As diferenças são significativas para $P < 0,05$.

7.3.1.5. Expressão de Cistatina salivares por *Western Blot*

Das 58 amostras para as quais foi feita imunomarcação com anticorpo primário anti-cistatinas S, SA e SN, resultaram marcações em condições de análise para o número de indivíduos referido na tabela 7.12.

Tabela 7.12 - Número de indivíduos em condições de análise para os níveis de expressão de cistatinas salivares

Fator (parâmetro a comparar)	Número de crianças
Percentil de IMC (N)	
Normoponderais	30
Excesso de peso	25
Sexo (N)	
Rapazes	31
Raparigas	24
Sensibilidade para o gosto amargo (N)	
sensíveis	32
Pouco sensíveis	23
Sensibilidade para o gosto doce (N)	
Sensíveis	16
Pouco sensíveis	36

As proteínas cistatinas tipo S, SA, SN foram detetadas como uma única banda com aproximadamente 13,6kDa, de massa molecular aparente, o que não está muito diferente da massa molecular teórica das cistatinas S, SA e SN (16,2kDa).

Apesar de não se ter observado interação significativa entre os fatores sexo e grupo de percentil de IMC, o valor de P obtido foi relativamente pequeno ($P=0,102$), pelo que a análise foi feita também em separado para cada um destes fatores.

Considerando o total de crianças, não se observaram diferenças significativas entre grupos de percentil de IMC [normoponderais: $787,59 \pm 83,69$; excesso de peso (pré-obesos + obesos): $725,88 \pm 121,69$ ($P=0,239$)]. O mesmo foi observado considerando apenas raparigas [normoponderais: $754,61 \pm 129,12$; excesso de peso: $916,73 \pm 134,40$ ($P=0,512$)] e apenas rapazes [normoponderais: $722,21 \pm 83,30$; excesso

de peso: $573,20 \pm 124,60$ ($P=0,132$)]. Os valores referem-se ao volume ajustado das bandas marcadas com o anticorpo (intensidade*área).

No que diz respeito aos níveis de expressão desta proteína, tendo em conta os grupos de sensibilidade para o gosto amargo, observaram-se diferenças apenas em crianças com excesso de peso (pré-obesas+obesas), nas quais as pouco sensíveis apresentaram níveis de expressão mais elevados, comparativamente a sensíveis [sensíveis: $395,45 \pm 79,81$; pouco sensíveis: $989,39 \pm 189,35$ ($P=0,0011$)]. Fazendo a análise separadamente para cada sexo, estas diferenças observaram-se apenas em raparigas [sensíveis: $417,51 \pm 131,64$; pouco sensíveis: $1472,11 \pm 291,96$ ($P=0,004$)]. Nos rapazes com excesso de peso não existem diferenças significativas [sensíveis: $373,39 \pm 100,56$; pouco sensíveis: $559,43 \pm 89,19$ ($P=0,187$)] (figura 7.12). Os valores referem-se ao volume ajustado das bandas marcadas com o anticorpo (intensidade*área).

No que diz respeito aos grupos de sensibilidade para o gosto doce, não se observaram diferenças entre crianças sensíveis e pouco sensíveis, em termos de níveis de expressão de cistatinas salivares (Tabela 7.13).

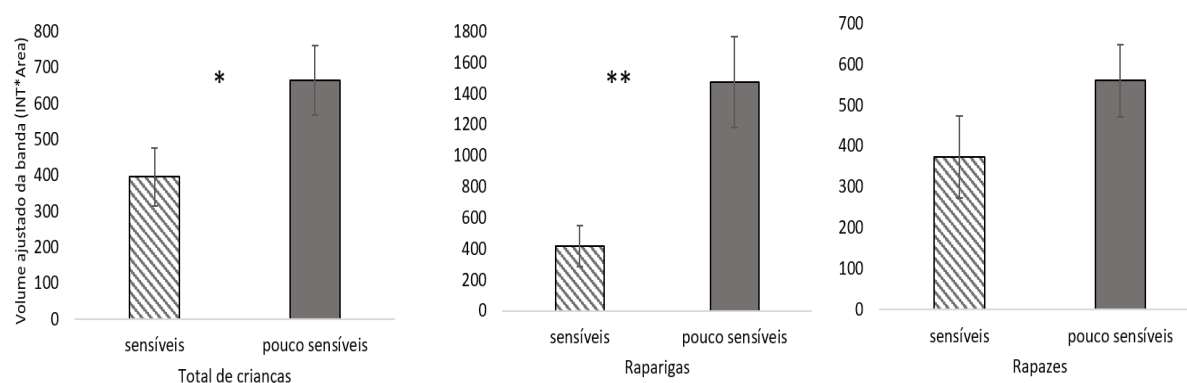


Figura 7.12 – Níveis de cistatinas S, SA e SN presentes nas amostras de saliva mista de crianças com excesso de peso (pré-obesas + obesas), com diferentes sensibilidades para o amargo. Densidade ótica foi obtida usando uma análise densitométrica. Os dados correspondem a média \pm EPM (diferenças são estatisticamente significativas para: * $P < 0,05$ ou ** $P < 0,01$).

Tabela 7.13- Expressão de cistatinas (intensidade*área), tendo em conta o sexo e percentil IMC, entre diferentes grupos de sensibilidade para o gosto doce

Expressão de cistatinas salivares (média ± erro padrão)	Total crianças	Raparigas	Rapazes	Normoponderais	Excesso de peso
Sensíveis	685,0±72,9	672,6±106,6	697,4±106,8	741,3±86,0	561,2±132,5
Pouco sensíveis	714,0±86,6	808,1±165,9	588,27±72,7	733,32±97,5	618,31±131,4
P	0,570	0,500	0,432	0,956	0,823

Visto que há diferenças inter-individuais na concentração em proteína total das amostras de saliva, a quantidade de cistatinas S, SA e SN, por unidade de volume de saliva foi avaliada. Para isso, os dados foram normalizados tendo em conta a concentração proteica individual. Neste caso, comparando a expressão entre diferentes grupos de percentil de IMC, continuamos a não observar diferenças estatisticamente significativas. Relativamente à comparação entre grupos de sensibilidade para o amargo, as diferenças são no mesmo sentido do observado anteriormente, apenas o total de crianças deixou de apresentar diferenças significativas (figura 13). A comparação entre os diferentes grupos de sensibilidade para o gosto doce, continua sem apresentar diferenças estatisticamente significativas.

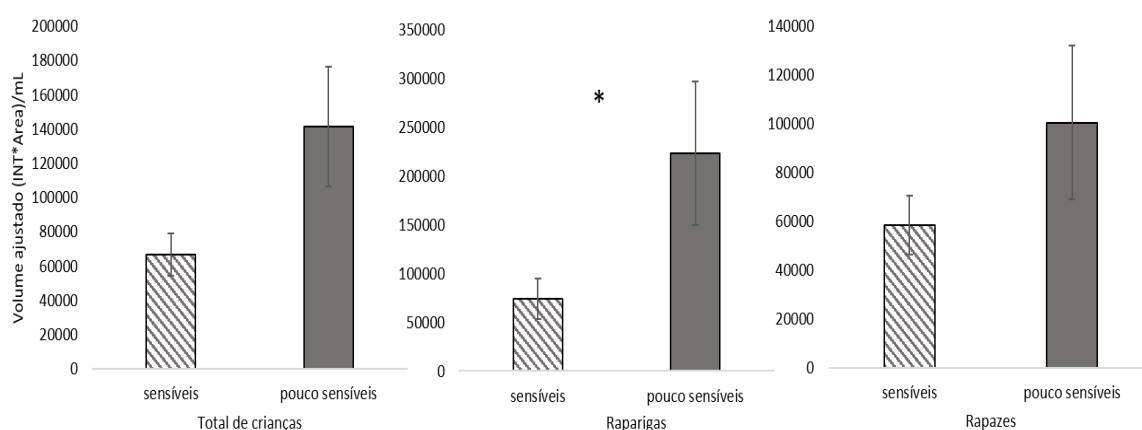


Figura 7.13 – Níveis de cistatinas S, SA e SN, por unidade de volume, presentes nas amostras de saliva mista de crianças com excesso de peso (pré-obesas + obesas), com diferentes sensibilidades para o amargo. Densidade ótica foi obtida usando uma análise densitométrica. Os dados correspondem a média ± EPM (diferenças são estatisticamente significativas para: * P<0,05)

7.4. Discussão

Este trabalho apresenta como principal objetivo avaliar a relação entre a sensibilidade para os gostos doce e amargo e a composição proteica salivar em crianças.

À semelhança do que havia sido referido nos capítulos 4 e 5, no estudo com adultos, também no presente trabalho foram identificadas diferenças entre sexos nos níveis de algumas proteínas salivares. Quer nos perfis proteicos obtidos por SDS-PAGE, quer nos obtidos por eletroforese bi-dimensional, a proteína α -amilase salivar foi identificada para bandas/*spots* aumentados em rapazes (banda F, spot 97) e para outros aumentados em raparigas (banda F1, spots 16 e 17). Esta maior expressão de isoformas de amilase de massa molecular mais elevada (possivelmente glicosiladas, de acordo com Hirtz, 2005) em rapazes do que em raparigas, e vice-versa, poderá estar associada a diferenças funcionais desta proteína (Hirtz, 2005). Estudos anteriores não observaram diferenças na expressão da enzima α -amilase salivar entre sexos, tanto em condições basais, como em condições de *stress* agudo (revisto em Rohleder & Nater, 2009).

Para além da amilase salivar, foram identificadas outras proteínas salivares diferencialmente expressas entre rapazes e raparigas, tais como: proteínas região C da cadeia K de imunoglobulina, recetor polimérico de imunoglobulina, CA-VI, PIP, zinco- α -2 glicoproteína e cistatinas S e SN. As proteínas região C da cadeia K de imunoglobulina, recetor polimérico de imunoglobulina, PIP, zinco- α -2 glicoproteína e CA-VI, apresentaram expressão significativamente mais elevada em raparigas, comparativamente a rapazes. Pelo contrário, as proteínas cistatina S e SN apresentaram expressão significativamente mais elevada em rapazes, comparativamente a raparigas, sendo este resultado confirmado pela comparação de perfil uni e bidimensional.

Tal como se constatou em adultos (capítulos 4 e 5), escassos são os estudos onde realizaram comparação entre o perfil proteico de rapazes e raparigas. Sivakumar *et al.* (2009) compararam a composição da saliva, em termos de proteínas secretoras, em crianças de 6-15 anos de idade e em adultos. Também neste estudo não foi feita qualquer tipo de referência a diferenças entre sexos em termos de perfil proteico salivar, tendo sido apenas referido que, em crianças, não foram observadas diferenças na concentração proteica total entre sexos.

No presente trabalho observaram-se diferenças nos perfis proteicos de crianças normoponderais e com excesso de peso (pré-obesas e obesas). Uma das proteínas

aumentadas nas crianças com excesso de peso foi a α -amilase salivar. Em trabalhos anteriores, realizados em adultos (Lamy *et al.*, 2015) e modelos animais (Rodrigues *et al.*, 2015) também foram observadas diferenças nos níveis desta proteína associados à obesidade, ainda que no caso do estudo realizado com mulheres adultas (Lamy *et al.*, 2015), as isoformas de amilase aumentadas em indivíduos obesos corresponderem a proteínas com massas moleculares mais baixas que a massa teórica, o que sugere maior proteólise na saliva de mulheres obesas. No caso das crianças do presente estudo isso não se observou. Por sua vez, foram observados níveis de expressão de algumas cadeias de imunoglobulinas diminuídos na saliva de crianças obesas. Este resultado está de acordo com um estudo anterior, no qual observaram menores níveis da proteína IgA na saliva de crianças (6-13 anos) obesas (Pallaro *et al.*, 2002), o que sugere a existência de alterações no sistema imunitário no caso de obesidade.

A proteína PIP foi também identificada em duas bandas diferencialmente expressas entre crianças normoponderais e com excesso de peso: banda J, com massa molecular aparente de 15,3kDa, e banda K, com massa molecular aparente de 13kDa. No entanto, as diferenças de expressão não são no mesmo sentido em ambas as bandas, pois enquanto que na banda J esta proteína encontra-se significativamente aumentada em crianças normoponderais, na banda K encontra-se significativamente aumentada em crianças com excesso de peso. Esta diferença que se observou na mesma proteína, mas com diferente massa molecular, pode levar à hipótese de existir mais proteólise ao nível desta proteína no caso de indivíduos com excesso de peso. Vors *et al.* (2015), observaram que jovens obesos com uma dieta rica em gordura apresentaram níveis de proteólise salivar mais elevado, comparativamente a jovens normoponderais. No entanto, mais estudos são necessários para elucidar esta questão.

Um dos *spots* identificados como cistatina S também apresentou níveis de expressão mais elevados nas crianças obesas. Também em adultos haviam sido observados níveis mais elevados de cistatinas em mulheres obesas, comparativamente a normoponderais (Lamy *et al.*, 2015) A análise da banda K (obtida por separação SDS-PAGE e identificada como mistura de cistatinas) foi feita por LC-MS/MS e revelou níveis de cistatinas A, B e SA significativamente mais elevados em crianças com excesso de peso, o que vai de encontro aos resultados obtidos nos perfis proteicos bidimensionais. Ainda que as diferenças não tenham sido estatisticamente significativas, a nível da cistatina C também se observou uma tendência para níveis mais elevados em obesos, particularmente quando considerando os níveis por unidade de volume de saliva.

Tal como referido no capítulo 4, as cistatinas salivares são agrupadas em três famílias diferentes: I (cistatinas intracelulares), II (cistatinas extracelulares) e III (cistatinas intravasculares). As cistatinas A e B (família I) pertencem a uma família

diferente da cistatina SA (família II) (de Sousa-Pereira *et al.*, 2013). Que seja do nosso conhecimento, este é o primeiro estudo onde se observou uma associação entre as cistatinas salivares A e B e o IMC. Outros trabalhos observaram um aumento de expressão desta proteína na saliva de obesos, mas apenas das isoformas S, SA e SN, visto que essa observação foi feita com base nos resultados de *western Blot* (Lamy *et al.*, 2015).

A principal função biológica das cistatinas consiste na inibição de proteases de cisteína, sendo que as diferentes isoformas diferem nas propriedades de inibição (Baron *et al.*, 1999). Estudos anteriores mostraram o papel de certas proteases de cisteína, como as catepsinas, no desenvolvimento da obesidade (revisto em Lafarge *et al.*, 2010). Com efeito, observou-se que as catepsinas, principalmente as catepsinas K, L e S, têm um papel importante na diferenciação dos adipócitos, contribuindo para o desenvolvimento dos mesmos: têm a capacidade de degradar proteínas da matriz extracelular, principalmente fibronectina, cuja degradação é necessária para a adipogénese (Antras *et al.*, 1989; revisto em Lafarge *et al.*, 2010). Este envolvimento das catepsinas no desenvolvimento da obesidade foi reforçado por um estudo recente que demonstrou que ratos com níveis reduzidos de catepsinas apresentaram uma diminuição do ganho de peso (Yang *et al.*, 2008). Visto que as catepsinas são um dos alvos principais das cistatinas, existem estudos que observaram um aumento dos níveis de cistatina C em circulação associado à obesidade (Wasen *et al.*, 2003; Luc *et al.*, 2006). Estes estudos apresentaram a hipótese do aumento da cistatina C no sangue poder fazer parte dos mecanismos reguladores envolvidos no controlo do papel das catepsinas ao nível dos adipócitos. No caso específico deste trabalho, podemos também colocar a hipótese das cistatinas A e B poderem desempenhar um papel importante no controlo de catepsinas associadas ao desenvolvimento da obesidade. Ainda que a grande proporção de cistatinas presente na saliva seja de origem glandular (maioritariamente provenientes das glândulas submandibulares) (Veerman *et al.*, 1996), alguma passagem direta através do sangue não é de excluir (Schenkels *et al.*, 1995). Assim, há a hipótese dos níveis mais elevados de cistatinas na saliva de obesos refletirem uma resposta salivar semelhante ao que acontece no plasma. O facto da grande diferença entre normoponderais e excesso de peso ser para as cistatinas A e B, havendo uma menor diferença, no que diz respeito à C, pode estar relacionada com especificidades dos diversos tipos de cistatinas para diferentes tipos de catepsinas (Baron *et al.*, 1999). Por outro lado, tendo em conta que as cistatinas (e particularmente as formas S, SA e SN), são proteínas salivares maioritariamente produzidas pelas glândulas submandibulares (Veerman *et al.*, 1996), uma maior presença na saliva de crianças com excesso de peso poderá indiciar uma maior contribuição deste tipo de

glândulas para o total de saliva, nestas crianças. Noutros estudos foram observadas concentrações em proteína total mais elevadas, associadas a menores taxas de secreção, em mulheres obesas, o que poderia indicar menor contribuição das glândulas parótidas para o total da secreção (Lamy *et al.*, 2015). No entanto, no presente estudo não foram observadas nem diferenças a nível da concentração proteica da saliva, nem da sua taxa de secreção. Que seja do nosso conhecimento, este é o único estudo que relaciona os níveis de cistatinas A e B com o excesso de peso, sendo que mais estudos são necessários que elucidar esta relação.

Poucos são os estudos em que a análise da composição proteica da saliva em crianças foi estudada no contexto da sensibilidade gustativa. A maioria dos estudos na área da proteômica salivar em crianças avalia alterações no proteoma provocadas por determinadas patologias, como diabetes tipo I (Javed *et al.*, 2009; Cabras *et al.*, 2010) e fibrose cística (Livnat *et al.*, 2010), ou efeito de cáries dentárias (Zehetbauer *et al.*, 2009). Outros estudos avaliam alterações no proteoma salivar em crianças em função da idade e erupção dentária (Ben-Arych *et al.*, 1990; Morzel *et al.*, 2011). O estudo mais semelhante ao apresentado neste capítulo é o de Morzel *et al.* (2014), no qual a relação entre o perfil proteico salivar, através de SDS-PAGE e a aceitação dos cinco gostos básicos é avaliada em crianças de três e seis meses de idade. Um dos grupos de proteínas que no referido estudo foi observada com expressão mais elevada no perfil proteico salivar de crianças com elevada aceitação para o gosto amargo, e por isso possivelmente menos sensíveis a este gosto, foi o grupo das cistatinas salivares.

No trabalho apresentado neste capítulo, tendo em consideração o gosto amargo, os resultados obtidos através de *Western Blot*, mostraram que as proteínas cistatina S, SN e SA apresentaram níveis significativamente mais elevados em crianças pouco sensíveis, mas só no grupo com excesso de peso. Foram obtidos resultados semelhantes através de separação proteica por SDS-PAGE. No entanto, isto não se observou em crianças normoponderais. Nestas últimas, pelo contrário, os níveis mais elevados de diversos tipos de cistatinas foram observados na saliva das crianças mais sensíveis. Níveis de cistatinas salivares mais elevados em indivíduos pouco sensíveis ao gosto amargo têm sido sugeridos em diferentes publicações de um grupo de investigadores franceses (Dsamou *et al.*, 2012; Morzel *et al.*, 2014; 2015). No entanto, nesses trabalhos, a comparação entre diferentes níveis de sensibilidade não teve em conta possíveis diferenças entre IMCs. Como foi visto anteriormente, os níveis de expressão destas proteínas diferem entre crianças normoponderais e crianças com excesso de peso, o que pode levar a estas diferentes relações cistatinas*sensibilidade entre os grupos das crianças normoponderais e com excesso de peso. Curiosamente,

Cabras *et al.* (2012), também referiram não ter observado maiores níveis de cistatina S na saliva de indivíduos pouco sensíveis ao amargo. E uma das diferenças na amostra estudada por estes autores e a amostra estudada por Dsamou *et al.* (2012) foi precisamente o facto da primeira ter IMCs compreendidos entre 18,6 e 25,3kg/m² (normoponderalidade) e a segunda IMCs compreendidos entre 19 e 30kg/m² (normoponderalidade + pré-obesidade).

Já no que diz respeito ao doce, observou-se uma expressão aumentada das cistatinas SN, S e A em crianças pouco sensíveis a este gosto, quer através da análise de perfis bidimensionais, quer através da análise da banda K por LC-MS/MS. No estudo de Morzel *et al.* (2014) foi referida a ausência de relação entre a aceitação para o gosto doce e a expressão de cistatinas salivares. Estes diferentes resultados podem dever-se a estes dois estudos estarem a avaliar parâmetros diferentes, como são sensibilidade e aceitação (Drewnowski *et al.*, 1997; Mennella *et al.*, 2016). Além disso, o estímulo doce, e mesmo a idade dos participantes, também diferiam, pois enquanto que no estudo de Morzel *et al.* (2014), a aceitação para o gosto doce foi avaliada através de uma solução de 0,2M de lactose, em bebés de 6 meses, no presente trabalho a sensibilidade para o doce foi avaliado através de limiares de deteção de sacarose, em crianças com 8-9 anos.

À semelhança do que tem sido sugerido para o gosto amargo, e uma vez que os mecanismos envolvidos na transdução destes dois gostos básicos apresentam semelhanças, também o aumento de cistatinas na saliva de crianças pouco sensíveis para o doce pode estar relacionado com baixos níveis de proteólise, devido à inibição de proteases de cisteína, a qual pode afetar a película mucosa que reveste a cavidade oral, reduzindo a acessibilidade das moléculas do gosto para os respetivos recetores (Dsamou *et al.*, 2012). O porquê de neste estudo isto se ter observado para o doce e o oposto se ter observado para o amargo, quando os mecanismos envolvidos na receção e transdução de sinal de ambos os gostos apresentam semelhanças, necessita ser estudado em trabalhos futuros.

À semelhança da proteína cistatina, também a proteína CA-VI tem sido referida em outros estudos como estando associada ao gosto amargo. Curiosamente, no caso particular deste trabalho, esta proteína encontra-se relacionada com o gosto amargo de forma oposta entre rapazes e raparigas. No estudo de Morzel *et al.* (2014), a proteína CA-VI foi identificada numa banda proteica com níveis de expressão em crianças com menor aceitação para o gosto amargo, sugeridas como crianças possivelmente mais

sensíveis a este gosto, no entanto no referido estudo não foi feita uma análise para cada sexo em separado. Esta proteína tem sido reportada como um fator trófico no crescimento e desenvolvimento dos gomos gustativos (Henkin *et al.*, 1999), sendo que carências nesta proteína têm sido associada com uma percepção gustativa diminuída (Shatzman & Henkin, 1981). Porém, existem controvérsias acerca da relação entre esta proteína e a percepção gustativa, sendo que alguns estudos não encontraram associação entre esta relação (Feeney & Hayes, 2014; Barbarossa *et al.*, 2015). O motivo pelo qual a CA VI, em crianças, está aumentada em rapazes pouco sensíveis ao amargo, enquanto em adultos está aumentada em homens sensíveis (capítulo 4), necessita de ser elucidado em estudos futuros. De qualquer forma há que ter em conta que adultos e crianças apresentam diferenças na composição salivar (Ben-Aryeh, *et al.*, 1990; Sivakumar *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2015) e na percepção gustativa (James *et al.*, 1997), o que pode levar a que a relação entre estes dois parâmetros não seja a mesma em faixas etárias diferentes. Para além disso, foram identificados polimorfismos nos genes que codificam esta proteína salivar, os quais foram relacionados com a função da mesma e com a percepção gustativa (Padiglia *et al.*, 2010), o que vem dificultar mais a explicação destes resultados, sem conhecer o genótipo, relativo a esta proteína, para os indivíduos avaliados nesta tese. Esta hipótese é reforçada pelos resultados obtidos para os níveis desta proteína salivar, em função da sensibilidade gustativa para o doce: enquanto que em adultos se observaram níveis de CA-VI mais elevados nos indivíduos pouco sensíveis, nas crianças são os rapazes sensíveis que apresentaram maiores níveis de expressão.

Para além das proteínas referidas anteriormente, as proteínas PIP e albumina foram identificadas como apresentando níveis de expressão diferentes entre crianças sensíveis e pouco sensíveis ao gosto amargo. A proteína PIP apresentou níveis de expressão mais elevados em crianças pouco sensíveis para o gosto da cafeína, quer em rapazes, quer em raparigas, enquanto que para a albumina se observou o oposto. Considerando a proteína PIP, estudos recentes têm sugerido que esta proteína apresenta uma possível correlação com a aceitação do gosto amargo (ou seja, possível baixa sensibilidade gustativa) em crianças (Morzel *et al.*, 2014). Esta proteína salivar, tal como foi discutido no capítulo 1, apesar de ainda não ter a sua função completamente compreendida, desempenha um papel importante na regulação do sistema imunológico e atividade antibacteriana, estando também envolvida na formação do película que reveste os dentes (Hassan *et al.*, 2009). Os níveis elevados de PIP em indivíduos pouco sensíveis ou com elevada tolerância ao amargo, juntamente com estudos que reportaram um aumento desta proteína após a estimulação com estímulos aversivos

(Lorenz *et al.*, 2011), levam à hipótese que a secreção de a PIP pode, de alguma forma, responder a sensações orais aversivas.

A proteína albumina, presente principalmente no plasma, entra na cavidade oral através do fluido crevicular gengival. Tal como no presente estudo, também Dsamou *et al.* (2012) observaram uma expressão significativamente mais elevada de albumina na saliva de indivíduos adultos muito sensíveis ao amargo da cafeína. Níveis elevados de albumina são normalmente associados a certas patologias orais, como gengivite ou periodontite (Henskens *et al.* 1993; Gonçalves *et al.* 2010), não se sabendo exatamente a que nível esta proteína poderá influenciar a percepção gustativa.

Quer em rapazes, quer em raparigas, os níveis de alguns *spots* de α -amilase salivar estão aumentados em crianças pouco sensíveis ao gosto doce. A α -amilase salivar é uma das proteínas mais abundantes na saliva e tem como principal função a clivagem de ligações glicosídicas de hidratos de carbono complexos, iniciando assim a digestão do amido na boca, da qual resulta maltose, triose e oligossacáridos como produtos dessa digestão (Harris *et al.*, 1998). Este processo poderá ter efeito na percepção gustativa uma vez que resulta num aumento dos níveis de moléculas doces, como maltose e, posteriormente, glucose na cavidade oral (Santos *et al.*, 2012). Níveis mais elevados de amílase salivar em indivíduos pouco sensíveis para o gosto doce foram também observados em adultos (capítulo 5), especulando-se que esta menor sensibilidade se deva a uma “dessensibilização” na percepção de doce devido a uma estimulação mais “forte” aquando do consumo de alimentos contendo amido, por parte de pessoas com maiores níveis de amílase salivar, tal como foi sugerido para outras sensações (Matsuo, 2000). Considerando estudos anteriores realizados em crianças (Morzel *et al.*, 2014), esta proteína não se observou como estando relacionada com a aceitação dos gostos doce ou amargo. Pelo contrário, nos resultados apresentados neste capítulo observou-se que a mesma, além de se encontrar relacionada com ambos os gostos, a variação de expressão entre grupos de sensibilidade é a mesma tanto para o gosto amargo, como para o gosto doce, ou seja, observa-se um aumento significativo de expressão desta proteína em crianças pouco sensíveis ao gosto amargo e ao gosto doce, embora essa expressão seja observada em rapazes e raparigas no gosto doce e apenas em raparigas no gosto amargo. O facto de estar diferencialmente expressa apenas em raparigas tendo em conta a sensibilidade para o amargo, é algo que ainda necessita de ser elucidado.

No caso das proteínas recetor polimérico de imunoglobulina (PIgR) e região C da cadeia K de imunoglobulina (cadeia leve de imunoglobulinas), a situação é de certa forma semelhante ao que foi referido para a CA-VI. Ou seja, a diferença nos níveis presentes entre crianças com diferentes sensibilidades gustativas não vai, necessariamente, no sentido das diferenças encontradas em adultos (capítulos 1 e 2). Morzel *et al.* (2014) sugere que recetor polimérico de imunoglobulina (PIgR) possa estar associada a uma maior sensibilidade para o gosto amargo em crianças, o que vai de encontro aos resultados obtidos no caso das raparigas. Também para a proteína região C da cadeia K de imunoglobulina (cadeia leve de imunoglobulinas), foi referida uma expressão mais elevada em indivíduos sensíveis ao gosto amargo, em adultos (Dsamou *et al.*, 2012), o que já não foi observado por nós, no caso das crianças.

Os níveis de imunoglobulinas presentes na saliva são afetados pelo estado imunológico dos indivíduos (Lima *et al.*, 2010), sendo, por isso, difícil tirar mais conclusões acerca da sua relação com a sensibilidade gustativa. Ainda que aparentemente, as crianças avaliadas no presente trabalho tenham declarado ser saudáveis e não apresentassem sinais evidentes de doença, não conseguimos garantir que as mesmas estivessem livres de qualquer tipo de infeção/inflamação que afetasse os níveis de imunoglobulinas salivares.

Escassos são os estudos onde foi avaliada a relação entre a composição proteica da saliva e a perceção gustativa em crianças. Que seja do nosso conhecimento, este é o primeiro estudo que avalia essa relação tendo em conta o perfil bidimensional salivar e dois gostos básicos diferentes.

7.5. Conclusão

Tendo como principal objetivo a avaliação da relação entre a sensibilidade gustativa e a composição proteica da saliva em crianças, este estudo, mostra a essa relação com a sensibilidade para o gosto amargo, mas também com a sensibilidade para o gosto doce. Tal como observado em adultos, em crianças a maioria das proteínas, identificadas previamente como estando relacionadas com o gosto amargo, também se encontram relacionadas com o gosto doce. Os diferentes resultados obtidos para rapazes e raparigas e entre diferentes grupos de percentil de IMC, indicam a importância de considerar os dois sexos separadamente em estudos que envolvam dados salivares e sensoriais.

Um dos aspetos mais relevantes deste estudo, é o facto de se observarem diferenças evidentes entre o proteoma salivar de crianças normoponderais e com excesso de peso. Por um lado, os níveis de cistatinas marcadamente mais elevados em crianças com excesso de peso, levam à hipótese dessas proteínas poderem desempenhar um papel importante no controlo da formação do tecido adiposo, sendo esse controlo refletido na saliva. Por outro lado, tanto estas proteínas salivares como a α -amilase salivar, também mais abundante em crianças com excesso de peso, foram as proteínas observadas como estando presentes em níveis mais elevados em crianças pouco sensíveis ao gosto doce. Ainda que não se tenha observado uma relação significativa entre sensibilidade para o gosto doce e percentil de IMC (capítulo 6), não é de descartar que esta diferente composição salivar esteja envolvida em diferentes perceções orais entre crianças com diferentes percentis. No entanto, esta hipótese necessita ser testada em estudos futuros.

No que diz respeito à relação entre composição proteica da saliva e sensibilidade para o gosto amargo, uma das conclusões mais importante do presente trabalho é que a relação entre os níveis de cistatinas e a referida sensibilidade depende do IMC dos indivíduos, o que pode explicar alguns dos diferentes resultados obtidos por autores diferentes. Para além disso, não são todas as cistatinas que estão relacionadas com a perceção deste gosto básico, mas principalmente as cistatinas S e SA. Estes resultados também levantam a questão “até que ponto a relação entre os níveis de cistatinas salivares e a sensibilidade para o gosto amargo é uma relação causa-efeito”? Tendo em conta que trabalhos anteriores, com roedores, mostraram a indução destas proteínas salivares por alguns tipos de dieta (Katsukawa & Ninomiya, 1999), e uma vez que no presente trabalho os hábitos alimentares das crianças não foram avaliados, são necessários estudos futuros que ajudem a responder a esta questão.

Capítulo 8

**Relação entre o cortisol e amilase salivar com a sensibilidade
para os gostos doce e amargo em crianças**

8.1. Introdução

Nos últimos anos, têm surgido diversas evidências acerca da possível influência do *stress* no comportamento alimentar e desenvolvimento de obesidade (Dallman *et al.*, 2005; Dallman 2010; Groesz *et al.*, 2012). Tem sido sugerido que os níveis de cortisol ao acordar, uma medida da atividade do eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal (HPA), estão relacionados com o peso e a distribuição de gordura corporal, em adultos (Therrien *et al.*, 2007). Além disso, o *stress* parece levar a uma alteração das escolhas alimentares em adultos jovens, com preferência por alimentos doces muito calóricos e ricos em gordura (Zellner *et al.*, 2006; Epel *et al.*, 2001). Esta potencial desregulação do comportamento alimentar, observada em situações de *stress*, parece ter a participação de glucocorticoides, uma vez que num estudo em que foram administrados glucocorticoides em homens adultos (Metilprednisolona por infusão intravenosa), foi observado um aumento da ingestão de alimentos por parte dos mesmos (Tataranni *et al.*, 1996).

De entre os fatores que influenciam as escolhas dos alimentos, a percepção oral, e nomeadamente o gosto, tem um papel relevante. Alguns estudos iniciais apontaram no sentido da percepção do gosto também ser influenciada pelas condições psicológicas de cada indivíduo. Por exemplo, foi observado que a duração percebida das sensações dos gostos amargo, doce e ácido se reduz após *stress* psicológico (Nakagawa *et al.* 1996). Adicionalmente, foi observada a existência de relação entre *stress* agudo e a redução da percepção para os gostos doce, ácido e salgado (Al'Absi *et al.*, 2012).

A nível neurobiológico, os dois sistemas mais importantes que intervêm na resposta ao *stress* físico e psicológico são o eixo HPA e o sistema nervoso autónomo (SNA). Os compostos principais do eixo HPA que respondem ao *stress*, são os glucocorticoides, via estimulação do córtex das adrenais, enquanto que os do sistema nervoso autónomo são as catecolaminas epinefrina e norepinefrina (Tsigos e Chrousos, 2002).

Em humanos, o cortisol é o glucocorticoide mais estudado em resposta a situações de *stress*. O cortisol exhibe um padrão de secreção circadiano: apresenta níveis máximos ao início da manhã, diminui progressivamente ao longo do dia e atinge níveis mínimos antes da hora de dormir (Collomp *et al.*, 2016). O aumento dos níveis de cortisol salivar em situações de *stress* tem sido observado em diversos estudos: por exemplo, Dietrich e colaboradores (Dietrich *et al.*, 2013) constataram que níveis elevados de

cortisol (níveis de cortisol basal matinal), estão relacionados com sintomas de ansiedade e depressão em crianças.

Além do cortisol salivar, os níveis da enzima α -amilase salivar também têm sido utilizados para avaliar *stress*. Os níveis salivares desta enzima parecem correlacionar-se com a atividade do sistema nervoso autônomo, nomeadamente a atividade do sistema nervoso simpático, em crianças e adultos (Nater e Rohleder, 2009).

Tendo em conta o acima referido, coloca-se a hipótese de a sensibilidade gustativa poder estar relacionada com o *stress*. Assim, o objetivo deste trabalho foi o de identificar a existência de relação entre as sensibilidades para os gostos doce e amargo e os níveis de cortisol e α -amilase salivares, e, a existir, se essa relação difere entre crianças normoponderais e crianças com excesso de peso/obesidade.

8.2. Materiais e métodos

8.2.1. Indivíduos em estudo

Das 387 crianças em estudo, 117 foram escolhidas aleatoriamente para determinação dos níveis de cortisol salivar e 200 para determinação da atividade enzimática da α -amilase salivar. As crianças foram sujeitas, previamente, a uma avaliação antropométrica, avaliação da sensibilidade gustativa e recolha de saliva, tal como referido no capítulo 6.

8.2.2. Determinação dos níveis de cortisol salivar

A determinação dos níveis de cortisol na saliva, foi efetuada através do Kit Salimetrics® Cortisol Enzyme Immunoassay Kit. Este Kit baseia-se na reação competitiva entre o cortisol presente nas amostras de saliva e o cortisol conjugado com a enzima peroxidase, pelos locais de ligação ao anticorpo presente na microplaca.

Numa fase inicial, os reagentes *Cortisol Enzyme Conjugate*, tampão de lavagem e padrões de cortisol (0,012- 3,0 μ g/dL) foram preparados de acordo com as instruções do fabricante. 25 μ L das amostras de saliva, padrões e controlo foram pipetados para os poços da microplaca, seguindo-se a pipetagem de 200 μ L de solução *Cortisol Enzyme Conjugate*. As placas foram agitadas a 400rpm, durante 5 minutos e incubadas 1 hora, à temperatura ambiente. Após as lavagens, com tampão de lavagem, adicionaram-se 200 μ L de solução de substrato *TMB* a cada poço da microplaca, seguindo-se incubação

por 30 minutos, com agitação, no escuro, à temperatura ambiente. A reação foi interrompida com a adição de 50µL da solução *STOP*. A leitura foi posteriormente efetuada a 450nm (Glomax, Promega).

8.2.3. Atividade enzimática da α -amilase salivar

A atividade enzimática da proteína α -amilase salivar foi determinada através da utilização do kit Amylase Kinetic Enzyme Assay (Salimetrics®). Este método baseia-se na ligação do substrato cromogénico, 2-cloro-p-nitrofenol (PNP), com maltotriose. A enzima α -amilase salivar, nesta reação, reage com o substrato e produz 2-cloro-p-nitrofenol, o qual pode ser espectrofotometricamente medido a 405nm. O protocolo foi realizado em microplacas de 96 poços, de acordo com as instruções do fabricante.

7µL das amostras de saliva (previamente diluídas com a solução *α -amylase diluente*) e controlo foram pipetados para os poços da microplaca, seguindo-se a pipetagem de 280µL de solução *α -amylase substrate* (previamente aquecida a 37°C). A placa foi de seguida incubada durante 1 minuto, a 37°C e com agitação a 500 rpm. Após o primeiro minuto é efetuada a primeira leitura a 405nm (Glomax, Promega). Seguidamente, a placa é incubada nas mesmas condições durante mais 2 minutos, sendo efetuada nova leitura a 405nm (Glomax, Promega).

Os valores de atividade enzimática foram analisados tendo em conta a atividade por unidade de volume de saliva (U/mL), tendo em conta a atividade relativamente ao total de proteína salivar (calculado através do conhecimento da concentração em proteína total de cada amostra) (U/µg proteína total) e considerando a atividade por unidade de tempo (calculado através do conhecimento da taxa de secreção salivar de cada indivíduo) (U/min). Isto foi feito tendo em conta que a ativação do sistema nervoso simpático pode resultar numa maior secreção de amilase e, simultaneamente, num menor volume de saliva total (Nater & Rohleder, 2009; Garrett *et al.*, 1987), pelo que ter em consideração estas diferentes unidades poderá minimizar os efeitos de diferentes taxas de secreção salivar, por diferentes indivíduos.

8.2.4. Análise estatística

Todos os dados foram analisados usando estatística descritiva e inferencial e a normalidade e homocedasticidade foram avaliadas através dos testes de Kolmogorov-Sminorff e Levene, respetivamente. Quando os dados não apresentaram normalidade nem homoscedaticidade, a análise foi feita recorrendo a testes não paramétricos.

Foi feita uma ANOVA- GLM univariada tendo como fatores fixos o sexo e o grupo de percentil de IMC, de modo a avaliar a existência de interação entre estes dois fatores e diferenças para cada um deles.

Para comparação dos níveis de cortisol e amilase salivar entre os diferentes grupos de percentil de IMC e de sensibilidade gustativa foi realizado o teste T-Student ou o correspondente não paramétrico (Mann-Whitney). O coeficiente de correlação de Spearman foi utilizado para avaliar a existência de correlação entre cada um destes parâmetros salivares e o percentil de IMC ou os limiares para cada um dos gostos.

A análise estatística foi também realizada tendo em conta o rácio amilase/cortisol, uma vez que este é apontado como melhor indicador de desregulação do sistema de *stress* que o rácio cortisol/amilase, ou que cada um destes dois indicadores em separado (Ali & Pruessner, 2012).

As diferentes análises estatísticas foram realizadas através da utilização do *software* SPSS versão 22 e as diferenças foram consideradas significativas para um intervalo de confiança de 95% ($P < 0,05$).

8.3. Resultados

8.3.1. Diferenças entre sexos

Das amostras testadas, obtiveram-se valores de cortisol salivar em condições de análise para 112 amostras, correspondentes a 57 rapazes e 55 raparigas. No caso da atividade enzimática da amilase salivar, foram analisados valores correspondentes a 198 amostras, relativas a 100 rapazes e 98 raparigas.

Para o cortisol salivar, não se observou interação significativa entre os fatores sexo e grupo de percentil de IMC. Ao comparar os dois sexos, foi observado que as raparigas apresentam níveis de cortisol salivar significativamente mais elevados que os rapazes (raparigas: $0,12 \pm 0,01$; rapazes: $0,09 \pm 0,01 \mu\text{g/dL}$; $P=0,031$). No entanto, ao comparar os sexos tendo em conta o grupo de percentil de IMC, esta diferença apenas se observou para as crianças com excesso de peso (raparigas: $0,12 \pm 0,02$; rapazes: $0,07 \pm 0,01 \mu\text{g/dL}$; $P=0,022$), não havendo diferenças nos níveis de cortisol salivar entre rapazes e raparigas normoponderais (raparigas: $0,11 \pm 0,01$; rapazes: $0,10 \pm 0,01 \mu\text{g/dL}$; $P=0,513$) (Figura 8.1A).

Para a atividade enzimática da amilase por quantidade de proteína total salivar (U/ μ g) observou-se uma tendência para interação entre os fatores sexo e grupo de percentil de IMC ($P=0,088$). Considerando a atividade por volume de saliva ou por minuto, a interação entre os fatores já não se observou ($P=0,652$ e $P=0,938$, para a interação considerando a atividade por volume ou por minuto, respectivamente). Tendo em conta a tendência observada para interação entre fatores, no caso da atividade de amilase por μ g de proteína total, este parâmetro foi comparado entre sexos separadamente para normoponderais e excesso de peso. As diferenças entre sexos observaram-se apenas em crianças normoponderais, com rapazes a apresentarem valores significativamente mais elevados, comparativamente a raparigas (rapazes: $0,15\pm 0,01$; raparigas: $0,11\ 0,01\text{U}/\mu\text{g}$; $P=0,005$) (Figura 8.1B).

Em termos de atividade por unidade de volume (U/mL) apenas nas crianças normoponderais se observaram valores tendencialmente mais elevados em rapazes, comparativamente a raparigas (rapazes: $56,39\pm 4,08$; raparigas: $48,29\pm 3,72$ U/mL; $P=0,070$). Considerando a atividade por minuto (U/min) as diferenças são estatisticamente significativas para as crianças normoponderais (rapazes: $28,83\pm 3,11$; raparigas: $21,20\pm 3,12\text{U}/\text{min}$; $P=0,028$) (figura 8.1B)

Não se observaram diferenças entre sexos para o rácio Amilase/cortisol em crianças normoponderais (rapazes: $804,17\pm 184,56$; raparigas: $715,77\pm 154,26$; $P = 0,935$), nem em crianças com excesso de peso (rapazes: $1141,41\pm 339,8$; raparigas: $726,82\pm 139,8$; $P = 0,233$) (Figura 8.1C).

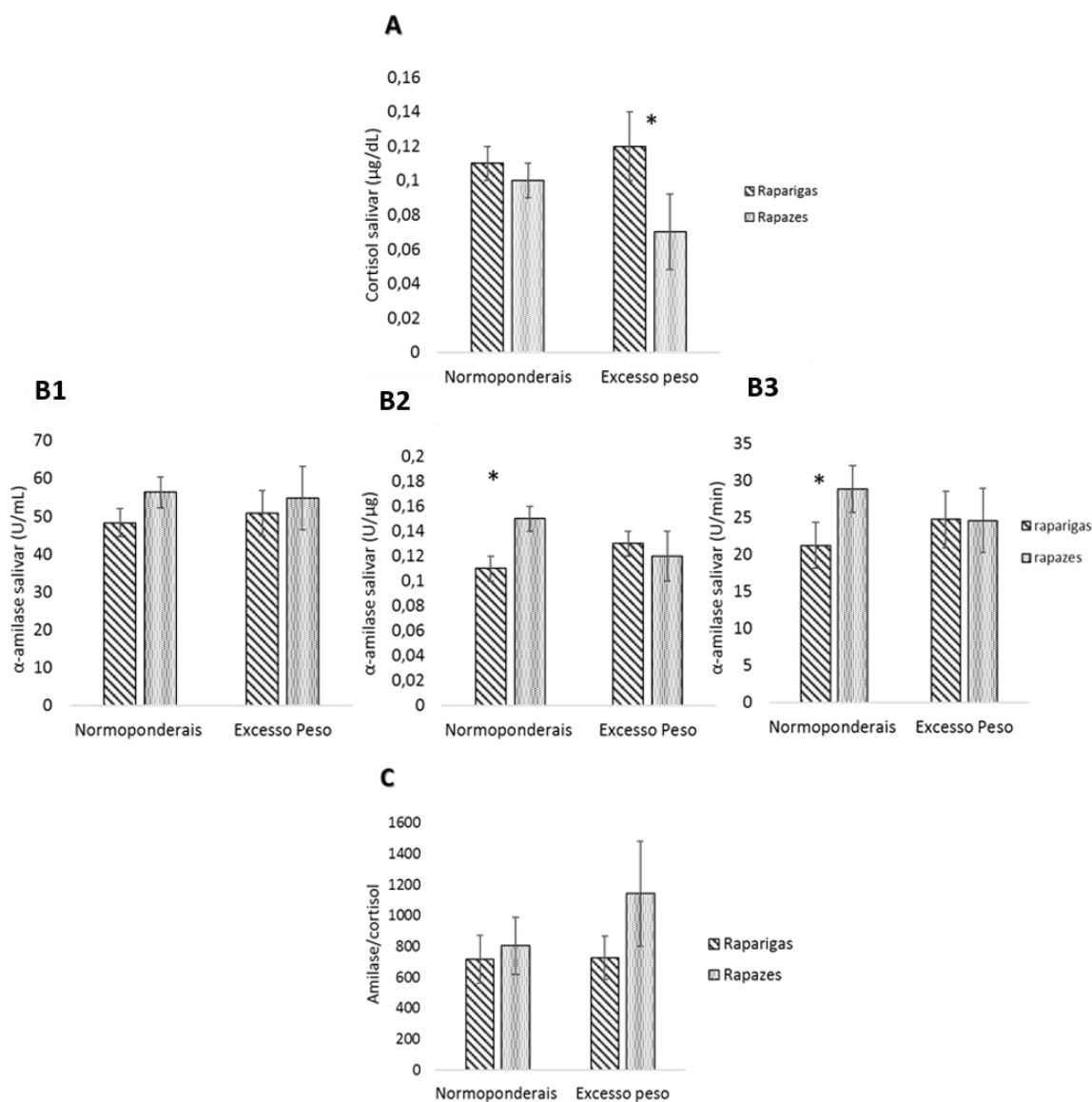


Figura 8.1- Comparação entre sexos tendo em conta (A) os níveis de cortisol salivar, (B) atividade enzimática de α -amilase salivar (B1 - U/mL, B2 - U/ μ g, B3 - U/min) e (C) rácio amilase/cortisol (média \pm EPM). * As diferenças são significativas para $P < 0,05$.

8.3.2. Diferenças entre percentis de IMC

Os níveis de cortisol salivar foram comparados entre crianças com diferentes percentis de IMC. Tendo em conta crianças normoponderais e com excesso de peso (crianças pré-obesas + obesas), as crianças com excesso de peso apresentaram níveis de cortisol salivar mais baixos do que crianças normoponderais ($0,094 \pm 0,0108$ vs. $0,14 \pm 0,007 \mu\text{g/dL}$, respetivamente para crianças com excesso de peso e normoponderais; $P=0,080$). Fazendo análise para cada sexo, individualmente, observou-se que esta

diferença ocorre apenas em rapazes (excesso de peso: $0,07 \pm 0,01$; normoponderais: $0,10 \pm 0,01 \mu\text{g/dL}$, $P=0,015$), e não em raparigas (excesso de peso: $0,12 \pm 0,01$; normoponderais: $0,12 \pm 0,02 \mu\text{g/dL}$; $P=0,801$). Nos rapazes observou-se mesmo uma correlação negativa entre o percentil de IMC e os valores de cortisol salivar (Figura 2).

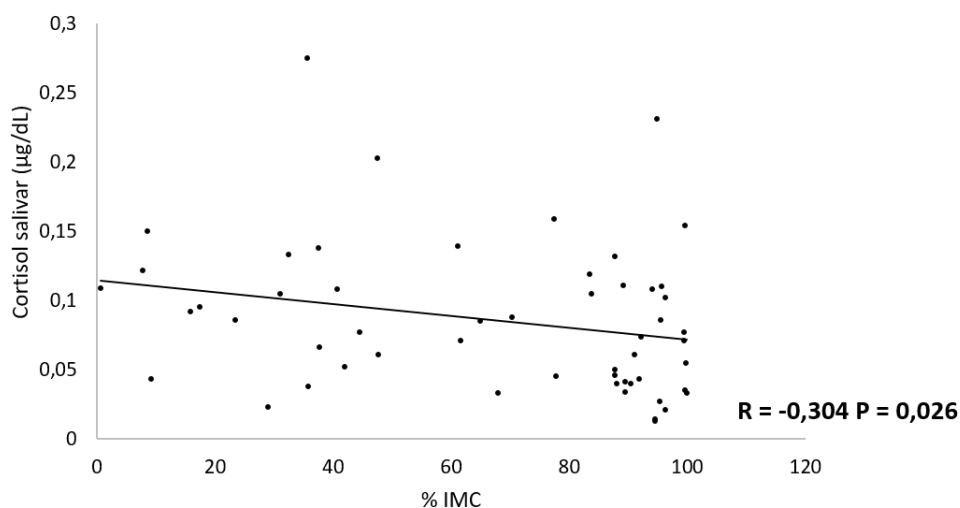


Figura 8.2 – Gráfico da correlação entre os níveis de cortisol salivar e o %IMC em rapazes.

Não foram observadas diferenças nos níveis (atividade enzimática) de amilase salivar, nem no rácio amilase/cortisol entre crianças com diferentes percentis de IMC.

8.3.3. Cortisol, amilase salivar e sensibilidade gustativa

No presente estudo observou-se que os níveis de cortisol salivar apenas apresentaram relação com a sensibilidade gustativa para o gosto doce, a qual varia consoante o sexo e o percentil de IMC das crianças. Já no caso da atividade enzimática da amilase, a relação deste parâmetro com a sensibilidade gustativa apenas de observou para o gosto amargo.

8.3.3.1. Gosto amargo

Não se observaram diferenças significativas nos níveis de cortisol de crianças com diferentes sensibilidades para o gosto amargo da cafeína.

No que diz respeito à atividade enzimática da amilase salivar, observaram-se diferenças entre as crianças pertencentes aos diferentes grupos de sensibilidade para

o amargo, mas apenas no caso dos rapazes normoponderais. Neste caso, os rapazes pouco sensíveis para o amargo apresentaram atividades enzimáticas de amilase salivar mais elevadas que os rapazes sensíveis para este gosto, quer considerando a atividade por unidade de volume (sensíveis: $40,08 \pm 5,24$; pouco sensíveis: $62,07 \pm 6,06$ U/mL; $P=0,008$) (figura 8.3A), quer por unidade de tempo (sensíveis: $17,84 \pm 3,67$; pouco sensíveis: $30,55 \pm 3,16$ U/min; $P=0,014$) (figura 8.3B). Em concordância com esta diferença entre grupos, observou-se uma correlação positiva entre a atividade enzimática de amilase e os limiares de deteção do gosto amargo da cafeína [$R=0,260$; $P=0,042$, considerando U/mL (figura 8.4A) e $R=0,356$; $P=0,0064$, considerando U/min (figura 8.4B)].

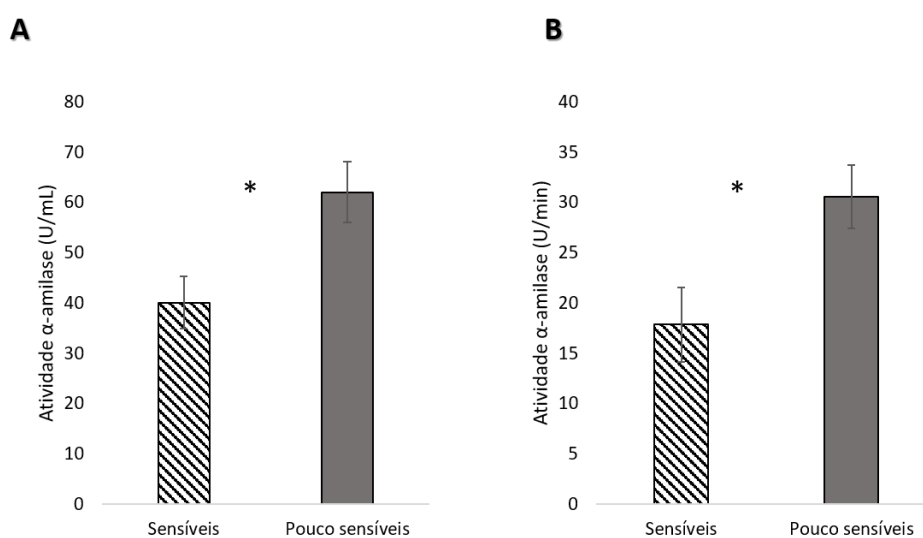


Figura 8.3 - Atividade enzimática da α -amilase (média \pm EPM) em amostras de saliva total de rapazes normoponderais com diferentes níveis de sensibilidade para o gosto amargo [(**A** - por unidade de volume (U/mL); **B** - por unidade de tempo (U/min); * - Diferenças são significativas para $P < 0,05$)].

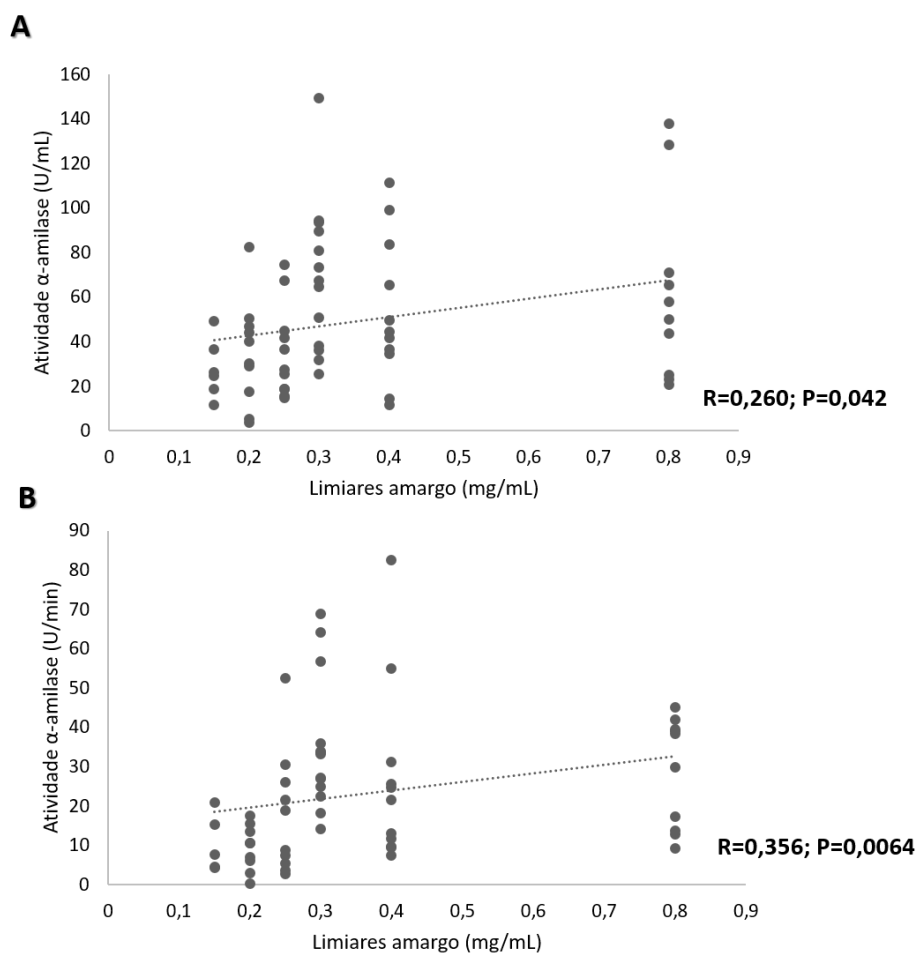


Figura 8.4 – Gráficos da correlação entre a atividade enzimática de α -amilase salivar e os limiars do gosto amargo em rapazes normoponderais. [(A) - por unidade de volume (U/mL); (B) - por unidade de tempo (u/min)].

Analisando os rácios amílase/cortisol, a relação entre estes e a sensibilidade para o gosto amargo apenas se observou em raparigas normoponderais. Nestas, são as sensíveis que têm rácios amílase/cortisol mais elevados (sensíveis: $1016,0 \pm 248,1$; pouco sensíveis: $366,5 \pm 104,2$; $P=0,038$). Ainda que o N de raparigas normoponderais, para as quais se conseguiram obter rácios amílase/cortisol não seja muito elevado ($N=14$), é de salientar a correlação negativa forte que se observou entre este rácio e os limiars de deteção do gosto amargo da cafeína ($R=-0,711$; $P=0,004$) (figura 8.5). Assim, quanto maior o limiar de deteção, ou seja, quanto menor a sensibilidade para o amargo, menor o rácio amílase/cortisol, em raparigas normoponderais.

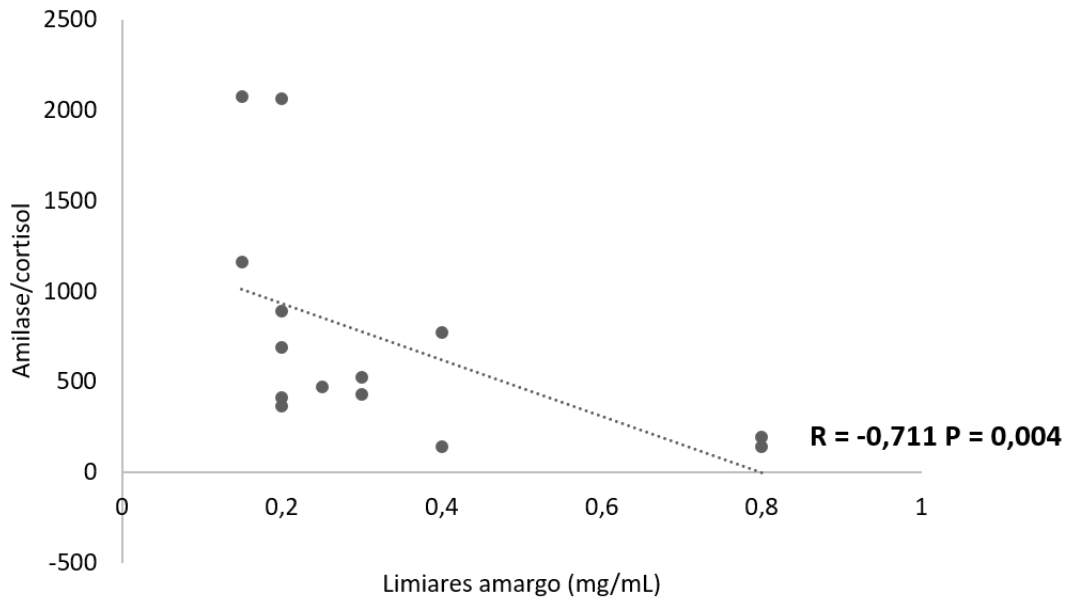


Figura 8.5- Gráfico da correlação entre o rácio amilase/cortisol e os limiares do gosto amargo para raparigas normoponderais.

8.3.3.2. Gosto doce

No que diz respeito ao gosto doce, a relação entre a sensibilidade gustativa e os níveis de cortisol salivar só se observou para os rapazes normoponderais: tendência para níveis de cortisol salivar mais elevados nos indivíduos sensíveis, comparativamente aos pouco sensíveis (sensíveis: $0,113 \pm 0,014$; pouco sensíveis: $0,078 \pm 0,01 \mu\text{g/dL}$; $P=0,052$), verificando-se uma correlação negativa moderada entre os valores de cortisol salivar e os limiares de doce ($R=-0,405$; $P=0,044$, coeficiente de correlação de *Spearman*) (figura 8.6).

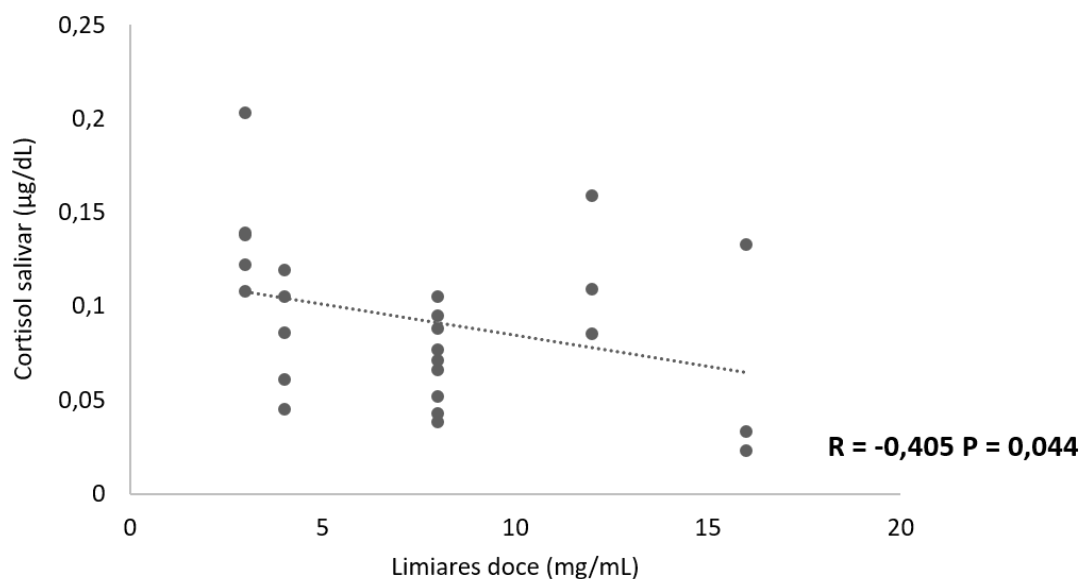


Figura 8.6- Gráfico da correlação entre os níveis de cortisol salivar e os limiares de doce para rapazes normoponderais.

Considerando a atividade enzimática da amilase salivar, não se observou relação entre este parâmetro e a sensibilidade para o gosto doce nem em rapazes nem em raparigas.

Em termos de relação entre rácio amilase/cortisol e gosto doce, esta apenas se observou no caso dos rapazes normoponderais, com rácios mais elevados nos rapazes pouco sensíveis ao gosto doce (sensíveis: $384,84 \pm 195,24$; pouco sensíveis: $1107,94 \pm 287,70$; $P=0,046$).

Os resultados referidos ao longo deste capítulo, nomeadamente, a comparação dos níveis de cortisol, amilase e rácio amilase/cortisol entre sexos, grupos de IMC e grupos de sensibilidade, encontram-se resumidos na tabela 8.1.

Tabela 8.1- Resumo dos resultados obtidos para os parâmetros salivares avaliados neste capítulo

	Cortisol salivar				Amilase salivar				Amilase/cortisol			
	Normoponderais		Excesso peso		Normoponderais		Excesso peso		Normoponderais		Excesso peso	
	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂
Comparação entre sexos	-	-	↑	↓	↓	↑	-	-	-	-	-	-
Comparação entre grupos de IMC	-	↑	-	↓	-	-	-	-	-	-	-	-
Sensibilidade gustativa amargo	-	-	-	-	-	↑ PS	-	-	↑ SS	-	-	-
Sensibilidade gustativa doce	-	↑ SS	-	-	-	-	-	-	-	↑ PS	-	-

(-) ausência de diferenças significativas; SS- sensíveis ao respectivo gosto; PS- pouco sensíveis ao respectivo gosto

8.4. Discussão

O objetivo principal deste trabalho consistiu em avaliar a existência de relação entre a sensibilidade gustativa e os níveis salivares de cortisol e amilase e, a existir, se essa relação difere consoante o percentil de IMC.

Numerosos estudos têm utilizado o cortisol salivar como biomarcador de *stress*, considerando neste conceito, não só respostas agudas a estímulos extremos, mas também alterações nos estados emocionais, como depressão por exemplo. Existem estudos que relacionaram os níveis de cortisol salivar com as escolhas alimentares (Michels *et al.*, 2013) e com o desenvolvimento de obesidade (Champaneri *et al.*, 2013). Para além do cortisol, os níveis da proteína α -amilase também têm sido utilizados como indicadores de diversos tipos de *stress*, neste caso refletindo a atividade do sistema nervoso autónomo (SNA), nomeadamente do sistema nervoso simpático, em crianças e adultos (Nater *et al.*, 2006). O aumento dos níveis desta proteína salivar tem sido reportado como estando associado a alterações emocionais/psicológicas em adultos (Nater *et al.*, 2005; Yamaguchi *et al.*, 2006a) e crianças (Yorbik *et al.*, 2016).

A possível interação entre estados emocionais (estejam eles relacionados com *stress* agudo, ou não) e o comportamento de ingestão foi alvo de alguns estudos, mas uma potencial interação entre os referidos estados emocionais e o sistema gustativo é menos conhecida. A maioria dos estudos que relacionaram os níveis de bioindicadores

de *stress* com o comportamento alimentar, foram desenvolvidos tendo em conta apenas o consumo e as escolhas alimentares dos indivíduos em estudo (Järvelä-Reijonen *et al.*, 2016). Os estudos que referiram alterações na perceção gustativa associadas a alterações nos níveis de cortisol salivar são estudos em que houve indução de *stress* (físico e/ou mental). Por exemplo, num estudo feito com astronautas, observaram-se alterações na duração da intensidade percebida de estímulos doces e amargos devidas quer a *stress* físico, quer a *stress* mental induzidos, as quais se correlacionaram com níveis de cortisol e amílase salivares (Rai & Kaur, 2012). No presente trabalho, o objetivo não foi avaliar alterações na sensibilidade gustativa resultantes de *stress* induzido, e por isso as crianças não foram sujeitas a nenhum tipo de situação de *stress*, mas sim avaliar se os níveis “basais” destes parâmetros salivares se relacionam com as respostas aos testes sensoriais.

Observou-se que quer os níveis de cortisol, quer os níveis de amílase salivares apresentaram alguma relação com a sensibilidade gustativa, mas que essa relação é dependente do tipo de gosto, do sexo e percentil de IMC. Este efeito do sexo e do IMC pode ser explicado pelo facto de já existirem diferenças, quer nos níveis de cortisol, quer nos níveis de amílase salivar, entre os sexos e grupos de IMC, independentemente da sensibilidade gustativa. Uma das hipóteses para níveis de cortisol diferentes entre raparigas e rapazes é haver uma influência hormonal, podendo os níveis de estrogénios estar a influenciar os níveis de cortisol. Uhart *et al.* (2006) referiram um possível efeito de esteroides sexuais, como o estrogénio, na modulação da atividade do eixo HPA (Uhart *et al.*, 2006). Embora as crianças que participaram neste estudo tenham 8-9 anos de idade, existem evidências de que as raparigas apresentam níveis mais elevados de estrogénio comparativamente aos rapazes, mesmo antes do aparecimento de sinais físicos da puberdade (Janfaza *et al.*, 2006). O facto da diferença entre sexos só se ter observado nas crianças com excesso de peso reforça esta hipótese, uma vez que o excesso de peso conduz a uma puberdade precoce (Wang, 2002) e está associado a níveis de estrogénios mais elevados (Zumoff, 1982). É possível que neste grupo de percentil de IMC as diferenças entre rapazes e raparigas fossem mais acentuadas. Por outro lado, pensar numa possível influência de hormonas sexuais, nos níveis de cortisol salivar, também faz sentido quando se observa que as diferenças entre crianças normoponderais e com excesso de peso só se observam nos rapazes. Se estiver correta a hipótese dos níveis de estrogénios afetarem os níveis de cortisol, não é de estranhar que as raparigas deste estudo, na faixa etária considerada, pudessem apresentar variabilidade entre os níveis destas hormonas, que impedisse a observação de diferenças entre grupos. No entanto, os níveis de hormonas sexuais não foram

avaliados no presente estudo, pelo que estas hipóteses terão que ser futuramente estudadas.

Considerando apenas os rapazes, foi nos normoponderais que se observaram os níveis de cortisol mais elevados. De modo semelhante ao nosso trabalho, Champaneri e colaboradores (Champaneri *et al.*, 2013) observaram uma correlação negativa significativa entre IMC (e perímetro da cintura) e os níveis de cortisol ao acordar. Os mesmos autores observaram também que esta relação foi ligeiramente mais forte nos homens, comparativamente a mulheres, o que, mais uma vez, vai ao encontro dos resultados apresentados neste capítulo. Ainda assim, os resultados de diferentes estudos não são consensuais quanto à relação entre os níveis de cortisol e IMC: enquanto alguns apresentaram uma associação positiva em crianças (Barat *et al.*, 2007; Reinehr *et al.*, 2013) e adultos (Ward *et al.*, 2003), outros observaram uma relação inversa (Hillman *et al.*, 2012) ou mesmo ausência de relação (Abraham *et al.*, 2013).

No que diz respeito à amilase salivar, também se observaram diferenças entre sexos, com os rapazes a registarem atividades enzimáticas significativamente mais elevadas, comparativamente às raparigas. Takai *et al.* (2007) referiram que os níveis de amilase salivar não diferem entre sexos e também nos ensaios realizados em adultos, que constam da presente tese, não se observaram diferenças na atividade enzimática, nem nos níveis de expressão de amilase, entre sexos (capítulo 5). Tendo em conta que esta é uma proteína salivar cujos níveis estão relacionados com o tipo de dieta (Perry *et al.*, 2007), as diferenças observadas entre rapazes e raparigas podem refletir diferentes hábitos alimentares. Neste trabalho este último parâmetro não foi avaliado, pelo que possíveis variações nos níveis de amilase relacionados com ingestão ficam por elucidar.

A sensibilidade para o gosto amargo parece não estar relacionada com os níveis de cortisol salivar. Já no que diz respeito aos níveis de amilase, estes apresentaram uma correlação positiva com os limiares de deteção do amargo da cafeína, no caso dos rapazes normoponderais. Diferentes hipóteses poderão explicar estes resultados. Por um lado, níveis de atividade enzimática de amilase mais elevados em rapazes pouco sensíveis poderão indicar maior atividade do sistema nervoso simpático, por parte destes e *stress* psicológico (Nater *et al.*, 2006). Níveis mais elevados de amilase salivar foram associados a menor duração da intensidade percebida de diferentes gostos, incluindo o amargo (Rai & Kaur, 2012). Por outro lado, em homens adultos, Dsamou *et al.* (2012) observou que os mais sensíveis ao gosto amargo da cafeína apresentavam maior quantidade de fragmentos de amilase, o que sugere que esta proteína possa

sofrer mais proteólise nesses indivíduos. Essa maior proteólise poderá implicar uma menor atividade enzimática nos indivíduos mais sensíveis. Por outro lado, tendo em conta que os níveis de amilase podem refletir o tipo de dieta habitualmente consumida (Perry *et al.*, 2007), não é de descartar que os níveis observados no presente estudo sejam consequência de diferentes hábitos alimentares. No entanto, esse parâmetro não foi avaliado.

Recentemente, Ali & Pruessner (2012), demonstraram que o rácio amilase/cortisol está mais forte e positivamente correlacionado com os níveis de ansiedade e depressão reportados pelos indivíduos em estudo, comparativamente ao rácio cortisol/amilase ou apenas aos parâmetros cortisol e amilase individualmente. No presente trabalho, no caso das raparigas normoponderais, observou-se uma correlação negativa forte entre o rácio amilase/cortisol e os limiares de deteção de amargo. Em termos evolutivos, sabe-se que a perceção do gosto amargo tem um papel importante na prevenção de ingestão de substâncias tóxicas, visto que a maioria das toxinas tem gosto amargo e causam aversão (Chandrashekar *et al.*, 2000). Além disso, estudos anteriores sugeriram que o *stress* e a depressão conduzem a uma diminuição da resposta imunológica, perturbando a comunicação entre o sistema nervoso central e o sistema imunológico (Reiche *et al.*, 2004). Tendo em conta estas evidências, e ainda que sejam necessários outros estudos para confirmar esta hipótese, não é de excluir que as raparigas com níveis de ansiedade/depressão mais elevados possam ser mais sensíveis ao amargo. Neste caso, podemos supor que uma maior sensibilidade ao amargo pode funcionar como uma defesa contra a ingestão de compostos potencialmente tóxicos em situações de maior debilidade imunológica.

Relativamente ao doce, observou-se que os níveis de cortisol se encontram relacionados com a sensibilidade para este gosto, estando os mesmos aumentados em rapazes normoponderais sensíveis. Uma hipótese tem a ver com o facto de níveis mais elevados de cortisol tenderem a promover um aumento da taxa metabólica (Brillon *et al.*, 1995), originando o catabolismo proteico em quase todas as células do organismo (Bueno *et al.*, 2011), que, por sua vez, estimulam a atividade dos sistemas que promovem maior ingestão de energia, como é o caso do aumento da sensibilidade para o doce. Ao contrário dos resultados obtidos no presente estudo, o *stress* agudo foi associado com a diminuição da perceção do gosto doce (Al'Absi *et al.* 2012). No entanto, no presente trabalho não houve nenhuma indução de *stress* agudo. Com os procedimentos efetuados no processo de avaliação de sensibilidade gustativa, os níveis de *stress* seriam muito atenuados e transitórios, resultando apenas da excitação resultante das recolhas de saliva. Considerando os resultados do rácio amilase/cortisol, indicado como melhor indicador de *stress* crónico (associado a estados depressivos), a

observação de rácios mais elevados em rapazes normoponderais pouco sensíveis ao gosto doce já vai de encontro aos resultados obtidos no estudo de Al'Absi *et al* (2012).

O facto da enzima α -amilase não estar relacionada com a sensibilidade para o doce em crianças, é um aspeto que não está de acordo com os resultados obtidos em adultos, no capítulo 5. Até ao momento, que seja do nosso conhecimento, não existe nenhum estudo que relacione a atividade desta enzima com a sensibilidade para o gosto doce. No entanto, uma vez que a digestão do amido, processo pelo qual esta enzima é responsável, leva à presença de açúcares na boca (Butterworth *et al.*, 2011), seria de esperar a relação desta enzima com a perceção do referido gosto. Uma hipótese para a ausência de relação pode estar relacionada com a influência da idade na sensibilidade gustativa (James *et al.*, 1997).

8.5. Conclusão

Um dos principais objetivos deste trabalho consistiu na identificação da relação entre os níveis cortisol e amilase salivares, o percentil de IMC e a sensibilidade gustativa em crianças do sexo masculino e feminino.

Este estudo apresenta algumas limitações que não devem ser desprezadas: por um lado, não foram avaliados os níveis de *stress*/estado emocional dos participantes com nenhum outro instrumento (ex. questionários), que não os biomarcadores salivares estudados; por outro lado, não foram avaliados os níveis de outros parâmetros, como hormonas, ou mesmo os hábitos alimentares, que se poderão relacionar com alguns dos resultados obtidos. Ainda assim, que seja do nosso conhecimento, este é o primeiro trabalho em que é avaliada a existência de relação entre os níveis basais de cortisol e amilase salivares (sem imposição de *stress* físico ou psicológico) e a sensibilidade gustativa. É de realçar que, mesmo sem indução de algum tipo de *stress* agudo, a sensibilidade gustativa relaciona-se com os níveis de cortisol salivar e principalmente com o rácio amilase/cortisol, que é referido como indicador de ansiedade ou estados depressivos. Estudos futuros deverão ser realizados no sentido de testar e melhor compreender estes resultados preliminares.

Capítulo 9

Relação entre os níveis de leptina salivar e a sensibilidade gustativa em adultos e crianças

9.1. Introdução

A leptina, uma hormona produzida principalmente pelo tecido adiposo branco, é responsável pela regulação da homeostase energética através da indução de saciedade e gasto de energia (Kwon *et al.*, 2016). Esta proteína de 16kDa é codificada pelo gene *ob* e, desde cedo, tem sido associada à obesidade (Halaas *et al.*, 1995).

Apesar da leptina atuar a longo prazo na homeostase energética, através da modulação dos circuitos hipotalâmicos que regulam o gasto de energia (Friedman & Halaas, 1998), tem sido também demonstrada uma ação de curto prazo na resposta neuroendócrina ao estado de jejum (Baile *et al.*, 2000). Ao longo dos últimos anos, a ação da leptina a nível de outros órgãos periféricos tem sido referida (Sáinz *et al.*, 2015). Foi demonstrado que o aumento da concentração de leptina no plasma tem como efeito a alteração das resposta olfativas aos odores de certos alimentos, não sendo consensual se esse efeito é no sentido de aumento (Thanos *et al.*, 2013) ou diminuição da resposta olfativa (Julliard *et al.* 2007; Prud'homme *et al.* 2009; Savigner *et al.* 2009).

Estudos realizados em humanos (Sanematsu *et al.*, 2009) e roedores (Shigemura *et al.*, 2004) levaram diversos autores a propor uma relação entre os níveis plasmáticos de leptina e o gosto doce. Contudo, os resultados de diferentes estudos não são consensuais: enquanto alguns reportaram uma diminuição na resposta ao estímulo doce (Kawai *et al.*, 2000; Yoshida *et al.*, 2013), outros observaram um aumento (Lu *et al.*, 2012) ou não observaram efeito na resposta ao gosto doce (Glendinning *et al.*, 2015).

O doce é o gosto básico que tem sido associado ao efeito da leptina, sendo defendido por alguns autores que esta hormona não influencia a resposta a outros gostos básicos (Jyotaki *et al.*, 2016). A perceção do gosto amargo, por exemplo, não foi observada como estando relacionada com os níveis de leptina circulantes (Yoshida *et al.*, 2015). No entanto, Wang *et al.* (2014) observaram que homens normoponderais sensíveis ao amargo do composto PTC, apresentaram níveis de leptina plasmáticos mais elevados, comparativamente a pouco sensíveis.

Diversos estudos têm reportado a presença de leptina na saliva. Apesar desta hormona estar presente na saliva em menor concentração do que no sangue, a existência de relação entre os níveis de leptina salivar e plasmáticos não é consensual,

sendo que em alguns estudos esta foi observada (Randeve *et al.*, 2003), mas noutros não (Aydin *et al.*, 2005; Thanakun *et al.*, 2014).

Apesar da sua função não ser completamente conhecida, a ação da leptina salivar ao nível dos recetores de leptina gástricos tem sido sugerida (Gröschl *et al.*, 2001). Já ao nível da cavidade oral, tem sido reportado o papel fisiológico desta hormona como fator de crescimento e proliferação de queratinócitos (Gröschl *et al.*, 2005). Recentemente, Gledinning *et al.* (Glendinning *et al.*, 2015), sugeriram que a leptina salivar pode atuar ao nível dos recetores presentes nas células gustativas, de um modo semelhante ao que foi reportado para o péptido de saciedade (PYY) (La Sala *et al.*, 2013). No entanto, esta hipótese não foi testada.

O presente estudo tem como objetivo avaliar a relação entre a leptina salivar e a sensibilidade para os gostos doce e amargo, em crianças normoponderais e obesas e adultos com diferente índice de massa corporal (IMC). Além disso, é também objetivo comparar os níveis de leptina na saliva entre adultos e crianças.

9.2. MATERIAIS E MÉTODOS

9.2.1. Indivíduos em estudo

Das 387 crianças em estudo, 121 (61 raparigas e 60 rapazes) foram escolhidas aleatoriamente para determinação dos níveis de leptina salivar. As crianças foram sujeitas, previamente, a uma avaliação da sensibilidade gustativa, recolha de saliva e determinação do percentil IMC, tal como referido no capítulo 6. Das 121 crianças selecionadas, 118 apresentaram classificação para o doce: 50 sensíveis e 68 pouco sensíveis a este gosto. Por outro lado, 112 apresentaram classificação para o amargo: 55 sensíveis e 57 pouco sensíveis a este gosto.

Dos 182 adultos em estudo, 74 (35 mulheres e 39 homens) foram escolhidos aleatoriamente para determinação dos níveis de leptina salivar. Os adultos foram sujeitos, previamente, a uma avaliação da sensibilidade gustativa, recolha de saliva e determinação de IMC, tal como referido no capítulo 4. Tendo em consideração a sensibilidade gustativa para o doce, foram avaliados 39 indivíduos sensíveis e 35 pouco sensíveis ao gosto doce. Tendo em consideração o fenótipo gustativo para o PROP, foram avaliados 23 indivíduos ST, 30 indivíduos MT e 21 indivíduos NT.

9.2.2. Quantificação dos níveis de leptina salivar

A determinação dos níveis de leptina na saliva, foi efetuada através do *Kit RayBio^R-Human Leptin ELISA*.

Numa fase inicial, os reagentes *Assay Diluent B*, *Assay Diluent A*, amostras e padrões de leptina (1,64 – 400pg/mL) foram preparados de acordo com as instruções do fabricante. 100µL das amostras de saliva e padrão, foram pipetados para os poços da microplaca, seguindo-se a incubação da mesma 2 horas e 30 minutos à temperatura ambiente. Seguidamente, adicionaram-se 100µL de anticorpo biotilado a cada poço da microplaca, seguindo-se incubação durante 1 hora, à temperatura ambiente. O passo seguinte consistiu na adição de 100µL da solução de Streptavidina a cada poço da microplaca, seguindo-se incubação por 45 minutos, com agitação suave, à temperatura ambiente. Seguidamente, foram pipetados 100µL do reagente *TMB One-Step Substrate* a cada poço da microplaca, seguindo-se incubação por 30 minutos, no escuro, com agitação suave, à temperatura ambiente. A reação foi interrompida com a adição de 50µL de solução *STOP* a cada poço. A leitura foi posteriormente efetuada a 450nm (Glomax, Promega).

Cada amostra foi analisada em duplicado e sem sofrer diluições.

9.2.3. Análise estatística

Todos os dados foram analisados usando estatística descritiva e inferencial, sendo a normalidade e homoscedaticidade avaliadas através dos testes Kolmogorov-Smirnoff e Levene, respetivamente.

A classificação dos indivíduos em sensíveis ou pouco sensíveis, para cada gosto, foi calculada através da mediana de cada limiar. Crianças foram consideradas como sensíveis ou pouco sensíveis se o limiar for inferior ou igual ou superior à mediana, respetivamente, tal como referido no capítulo 6. A comparação entre grupos de sensibilidade gustativa foi realizada através do Teste-T, enquanto a comparação entre grupos de percentil de IMC foi realizada através da análise *one-way ANOVA*.

As diferentes análises estatísticas foram realizadas através da utilização do software SPSS versão 22 e as diferenças foram consideradas significativas para um intervalo de confiança de 95% ($P < 0,05$).

9.3. RESULTADOS

9.3.1. Relação entre os níveis de leptina salivar e %IMC, idade e sexo

Comparativamente a adultos, as crianças apresentaram menor concentração de leptina na saliva ($9,67 \pm 0,46$ em crianças vs. $11,72 \pm 0,51$ pg/mL em adultos; $P = 0,003$) (figura 1).

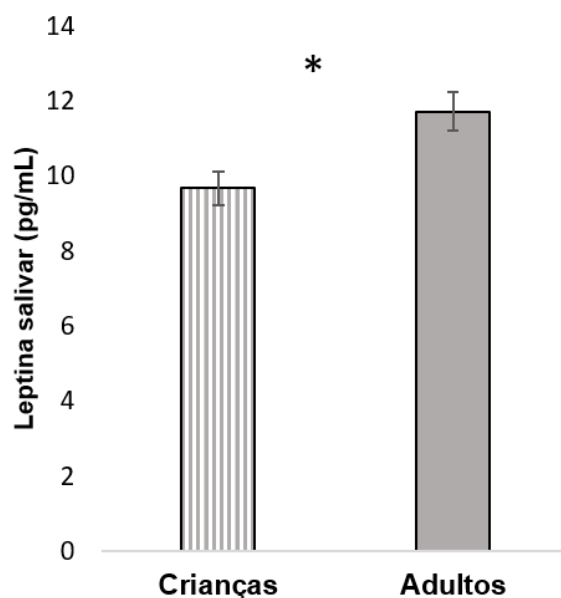


Figura 9.1- Comparação dos níveis de leptina salivar (pg/mL) entre crianças e adultos. * As diferenças são significativas para $P < 0,05$.

Tanto em crianças como em adultos, não foram observadas diferenças significativas na concentração de leptina salivar entre sexos. No entanto, tendo em consideração crianças normoponderais, observou-se uma tendência para rapazes apresentarem níveis mais elevados de leptina salivar, comparativamente a raparigas, embora essa diferença não seja estatisticamente significativa (rapazes: $10,55 \pm 0,90$; raparigas: $8,22 \pm 0,91$ pg/mL; $P = 0,073$) (Figura 9.2). Pelo contrário, em adultos

normoponderais os níveis de leptina foram semelhantes em homens e mulheres (homens: $12,52 \pm 1,12$; Mulheres: $11,17 \pm 0,66$ pg/mL; $P=0,290$) (figura 9.2).

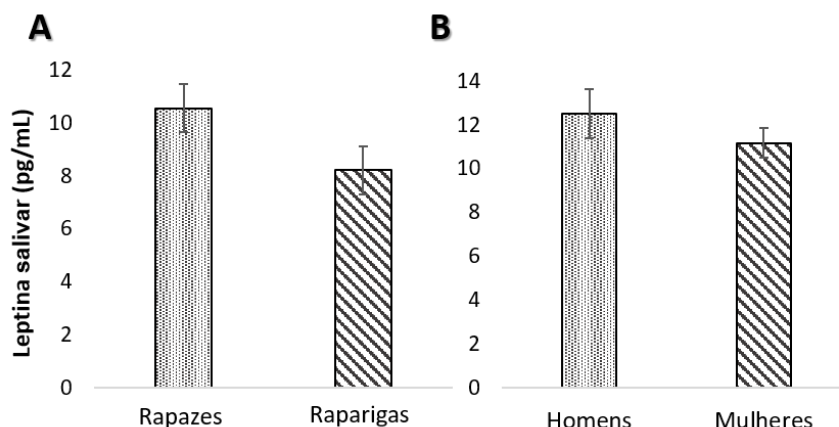


Figura 9.2 – Comparação entre sexos dos níveis de leptina salivar (pg/mL) em (A) crianças normoponderais e (B) adultos normoponderais.

Relativamente ao peso, não foram observadas diferenças significativas nos níveis de leptina salivar entre indivíduos com peso normal e com excesso de peso (pré-obesos + obesos), quer em crianças (normoponderais: $9,64 \pm 0,68$; excesso de peso: $9,93 \pm 0,66$ pg/mL; $P=0,764$), quer em adultos (normoponderais: $11,09 \pm 0,49$; excesso de peso: $11,24 \pm 0,97$ pg/mL; $P=0,882$). Contudo, em crianças, fazendo a análise separadamente para rapazes e raparigas observou-se uma ligeira tendência ($P=0,164$) para níveis de leptina salivar mais elevados em raparigas com excesso de peso ($9,87 \pm 0,85$ pg/mL), comparativamente a raparigas normoponderais ($8,22 \pm 0,91$ pg/mL) (figura 9.3). Nos adultos, não se observaram diferenças nem em homens, nem em mulheres.

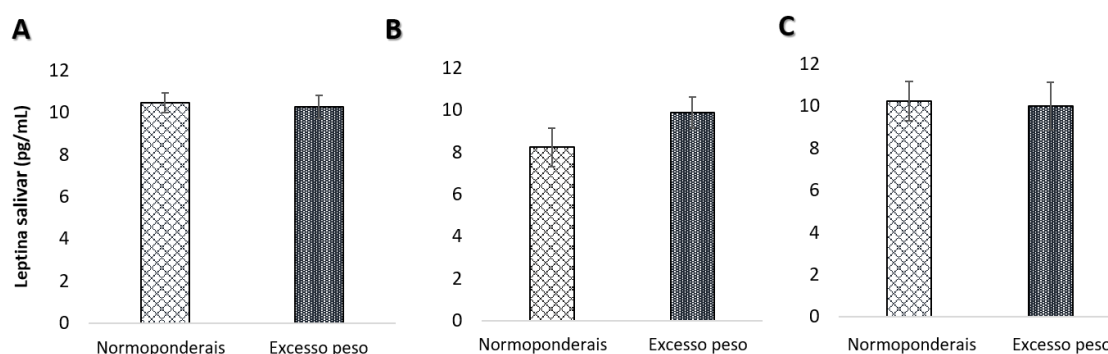


Figura 9.3 – Comparação da concentração de leptina salivar (pg/mL) entre indivíduos normoponderais e com excesso de peso. A comparação foi feita tendo em conta o total de indivíduos (crianças e adultos) (A) e tendo em conta apenas raparigas (B) e apenas rapazes (C), em crianças.

9.3.2. Relação entre os níveis de leptina salivar e a percepção do gosto doce

Tendo apenas em consideração as crianças, foi observada uma correlação moderada positiva entre os limiares de deteção da sacarose e a concentração de leptina salivar, em raparigas (Figura 9.4A, $R=0,263$, $P=0,046$), mas não em rapazes (Figura 9.4B, $R=0,044$, $P=0,737$).

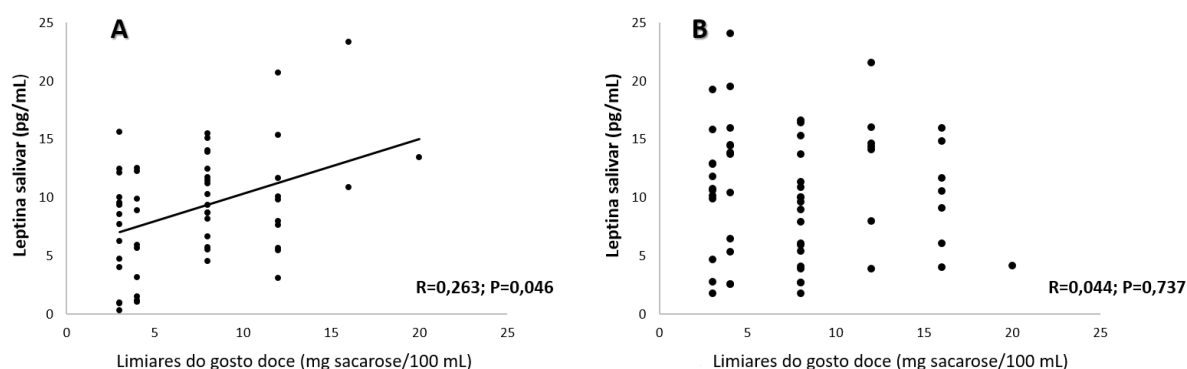


Figura 9.4 – Relação entre limiares de deteção da sacarose e concentração de leptina salivar em crianças (**A** – raparigas; **B** – rapazes; os limiares do gosto doce correspondem a concentrações de sacarose de 3, 4, 8, 12 e 16mg/100mL. Considerou-se limiar de 20mg/100mL para aquelas crianças que não detetaram nenhuma concentração de sacarose).

No grupo das raparigas sensíveis ao gosto doce, os níveis de leptina salivar foram cerca de 1,5 vezes menores do que no grupo de raparigas pouco sensíveis (raparigas sensíveis: $6,98 \pm 0,90$ vs. raparigas pouco sensíveis: $10,54 \pm 0,80$ pg/mL; $P=0,005$). Já os rapazes não apresentaram variação nos níveis de leptina salivar em função da sensibilidade para o gosto doce (rapazes sensíveis: $10,8 \pm 1,20$ vs. rapazes pouco sensíveis: $9,93 \pm 0,86$ pg/mL; $P=0,545$) (figura 9.5A). Ao comparar os níveis de leptina salivar entre grupos de sensibilidade para o doce, tendo em conta apenas as crianças normoponderais, as diferenças também só se observaram para raparigas [(raparigas sensíveis: $6,45 \pm 1,19$ vs. raparigas pouco sensíveis: $11,01 \pm 1,53$ pg/mL ($P=0,024$)], enquanto que os níveis de leptina salivar dos rapazes não diferiram entre grupos de sensibilidade [(sensíveis: $11,24 \pm 1,51$ vs. rapazes pouco sensíveis: $10,02 \pm 1,10$ pg/mL ($P=0,791$)]. Já nas crianças com excesso de peso não se observaram diferenças significativas entre grupos de sensibilidade para o gosto doce [(raparigas sensíveis: $7,91 \pm 1,35$ vs. raparigas pouco sensíveis: $10,20 \pm 8,56$ pg/mL ($P=0,151$);

rapazes sensíveis: $10,25 \pm 2,01$ vs. rapazes pouco sensíveis: $9,83 \pm 1,36$ pg/mL ($P=0,859$).

Ao contrário das crianças, nos adultos não foram observadas diferenças nos níveis de leptina salivar entre grupos de sensibilidade para o gosto doce, em nenhum dos sexos [(Mulheres sensíveis: $10,93 \pm 0,95$ vs. mulheres pouco sensíveis: $11,37 \pm 0,92$ pg/mL ($P=0,743$); homens sensíveis: $11,19 \pm 0,81$ vs. homens pouco sensíveis: $11,53 \pm 0,98$ pg/mL ($P=0,791$)] (figura 9.5B). Mesmo analisando em separado adultos normoponderais e adultos com excesso de peso, não foram observadas diferenças entre sensíveis e pouco sensíveis para o doce nos níveis de leptina salivar [(Normoponderais- mulheres sensíveis: $10,54 \pm 0,93$ vs. mulheres pouco sensíveis: $11,29 \pm 0,78$ pg/mL ($P=0,556$) e homens sensíveis: $12,09 \pm 1,25$ vs. homens pouco sensíveis: $10,61 \pm 1,09$ pg/mL ($P=0,791$); Excesso de peso- mulheres sensíveis: $12,19 \pm 2,87$ vs. mulheres pouco sensíveis: $11,59 \pm 3,01$ pg/mL ($P=0,891$) e homens sensíveis: $9,52 \pm 0,75$ vs. homens pouco sensíveis: $12,61 \pm 2,17$ pg/mL ($P=0,155$)].

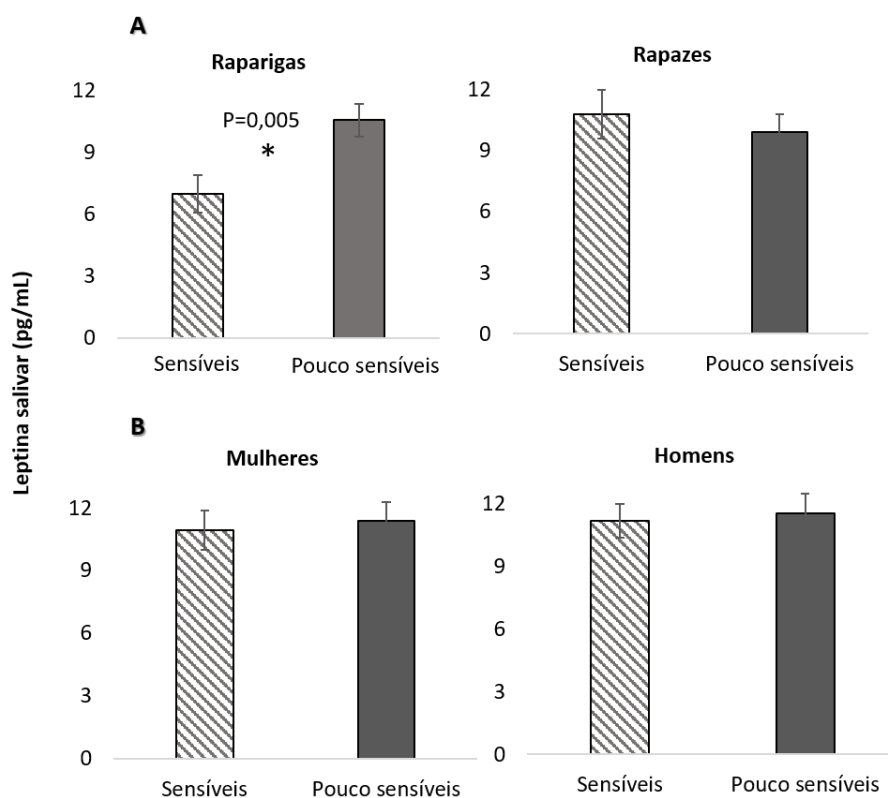


Figura 9.5 – Níveis de leptina salivar em crianças (A) e adultos (B) sensíveis e pouco sensíveis ao gosto doce. Os gráficos representam o total de crianças (normoponderais + excesso de peso) e o total de adultos (normoponderais + excesso de peso). * As diferenças são significativas para $P < 0,05$.

9.3.3. Relação entre os níveis de leptina salivar e a percepção do gosto amargo

Crianças com diferente sensibilidade para o gosto amargo não apresentaram diferenças nos níveis de leptina salivar. Esta ausência de relação foi observada tanto em crianças normoponderais (figura 9.6A), como crianças com excesso de peso e para ambos os sexos [Normoponderais- rapazes sensíveis: $9,88 \pm 1,75$ vs. rapazes pouco sensíveis: $10,73 \pm 1,15$ pg/mL $P=0,676$ e raparigas sensíveis: $8,32 \pm 1,84$ vs. raparigas pouco sensíveis: $8,81 \pm 0,99$ pg/mL $P=0,819$; Excesso de peso: rapazes sensíveis: $8,33 \pm 1,28$ vs. rapazes pouco sensíveis: $11,65 \pm 1,86$ pg/mL $P=0,155$ e raparigas sensíveis: $10,15 \pm 0,86$ vs. raparigas pouco sensíveis: $9,80 \pm 1,33$ pg/mL $P=0,824$]; valores de média \pm erro padrão].

No caso dos adultos foram observadas diferenças tendo em conta apenas indivíduos normoponderais: níveis mais elevados de leptina em indivíduos com resposta mais elevada para o PROP (ST). No entanto, esta diferença foi estatisticamente significativa apenas em homens [mulheres: ST- $10,32 \pm 0,60$ pg/mL; MT- $11,44 \pm 1,30$ pg/mL; NT- $10,81 \pm 1,18$ pg/mL ($P=0,755$); homens: ST- $14,4 \pm 1,8$ pg/mL; MT- $12,32 \pm 0,83$ pg/mL; NT- $9,31 \pm 2,07$ pg/mL ($P= 0,021$)], valores de média \pm erro padrão (figura 9.6B).

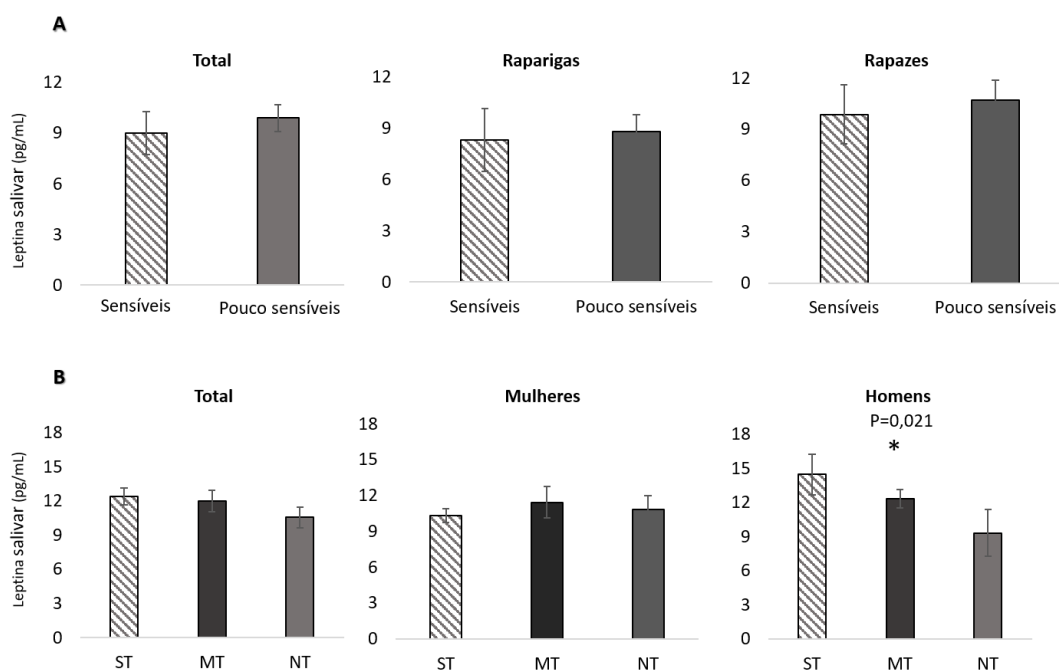


Figura 9.6 – Comparação dos níveis de leptina salivar entre indivíduos com diferente percepção para o gosto amargo. **A**- crianças normoponderais; **B**- adultos normoponderais (ST – *supertasters*; MT – *medium tasters*; NT – *nontasters*, para o composto PROP). *Diferenças estatisticamente significativas para $P < 0,05$, entre os grupos ST e NT em homens.

9.4. Discussão

Em 2001, Gröschl *et al.* identificaram, pela primeira vez, leptina na saliva humana (Gröschl *et al.*, 2001). Daí em diante foram colocadas diferentes hipóteses acerca das implicações da presença desta hormona na saliva. Embora alterações nos níveis plasmáticos de leptina tenham sido mencionadas como potencialmente envolvidas na percepção do gosto doce, mas não na percepção do gosto amargo (Yoshida *et al.* 2015), que seja do nosso conhecimento, não existem estudos em que os níveis salivares desta hormona tenham sido relacionados com a percepção gustativa. O presente estudo tem como objetivo testar a hipótese de que os níveis de leptina salivar possam estar relacionados com a percepção gustativa, tanto em adultos, como em crianças. Para tal, foram comparados os níveis de leptina salivar de crianças e adultos com diferentes respostas para os gostos doce e amargo. Além disso, foi também investigado o possível efeito do excesso de peso/obesidade na relação entre esta hormona e a sensibilidade gustativa.

Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre sexos. No entanto, e apenas em crianças, foi observada uma tendência para concentrações de leptina salivar mais elevadas em rapazes, comparativamente a raparigas. Diferentes estudos apresentaram resultados conflituosos: enquanto alguns autores reportam níveis elevados de leptina em mulheres, comparativamente a homens, em adultos (Randeve *et al.* 2003a) e adultos jovens saudáveis (Aydin *et al.* 2005), outros não observam diferenças (Idris *et al.* 2016; Thanakun *et al.* 2014).

No que diz respeito a diferenças nos níveis de leptina entre indivíduos normoponderais e com excesso de peso, alguns estudos referiram que os níveis de leptina plasmáticos se encontram correlacionados com o IMC, em adultos (Argente *et al.* 1997) e crianças (Maffei *et al.* 1995). Considerando a leptina presente na saliva, neste trabalho, não foram observadas diferenças significativas entre indivíduos normoponderais e com excesso de peso. Apenas em crianças foi observada uma tendência para níveis de leptina salivar mais elevados em raparigas com excesso de peso, comparativamente às normoponderais. Visto que a recolha de sangue é um processo invasivo, no presente estudo não foram avaliados os níveis de leptina plasmáticos. Como tal, não é possível afirmar se a ausência de relação entre os níveis de leptina salivares e IMC reflete uma ausência de relação entre este parâmetro e a leptina circulante. Os estudos que relacionaram os níveis de leptina salivar com o IMC, semelhantes ao apresentado neste capítulo, são discordantes: enquanto alguns referiram ausência de correlação entre os níveis de leptina salivar e IMC (Thanakun *et*

al., 2014), outros demonstraram uma correlação positiva entre estes parâmetros (Randeve *et al.*, 2003b).

Um aspeto relevante observado neste trabalho, é o facto da relação da leptina salivar com a perceção gustativa não ser a mesma para os diferentes gostos básicos em estudo, idade ou sexo. Para o gosto doce, uma relação entre a concentração de leptina salivar e a sensibilidade gustativa foi evidente em crianças do sexo feminino, sendo que raparigas pouco sensíveis apresentaram níveis de leptina salivar significativamente mais elevados, comparativamente a raparigas sensíveis. Apesar de alguns estudos apresentarem resultados contraditórios (Lu *et al.* 2012; Yoshida *et al.* 2013), nos últimos anos, a influência desta hormona na sensibilidade para o gosto doce tem sido considerada por diversos autores. No entanto, Glendinning *et al.* (2015) não observaram alterações nas respostas para o gosto doce com um aumento dos níveis de leptina no plasma. Embora estes autores tenham confirmado a expressão de recetores de leptina nas células do gosto, colocaram a hipótese de que esses recetores podem não ser suficientemente acessíveis para a leptina circulante, podendo o efeito da leptina no gosto doce ocorrer através de uma via parácrina, como a saliva. Os resultados apresentados neste capítulo são consistentes com a hipótese apresentada, uma vez que foi observado que os níveis de leptina salivar estão relacionados com a sensibilidade para o gosto doce. Foi também demonstrado que, em células enteroendócrinas, a leptina tem a capacidade de diminuir a perceção do gosto doce (Jyotaki *et al.* 2016).

A razão pelo qual as raparigas são o único grupo onde se observou uma relação entre a sensibilidade para o gosto doce e os níveis de leptina salivar, precisa de ser explorada. Uma hipótese está relacionada com a influência de estrogénios na ação da leptina. Embora as crianças que participaram neste estudo tenham entre 8-9 anos de idade, existem evidências de que as raparigas têm níveis mais elevados de estrogénios do que os rapazes, mesmo antes do aparecimento de sinais físicos de puberdade (Janfaza *et al.* 2006). Existem estudos que referem que os estrogénios induzem um aumento da sensibilidade para a ação da leptina, ao nível dos recetores desta hormona: ao nível do hipotálamo, leptina e estrogénio cooperam na regulação da homeostase energética (Clegg *et al.* 2006; Gao & Horvath, 2008). Por sua vez, a nível periférico, foi reportada uma interação entre a leptina e estrogénios (Alonso *et al.*, 2007).

De acordo com a possível interação existente entre leptina e estrogénios, seria expectável observar níveis de leptina salivar mais elevados em mulheres adultas pouco sensíveis, comparativamente às sensíveis. No entanto, no presente estudo, não foi isso

que se observou. Uma das possíveis justificações é a possibilidade de ter voluntários em diferentes fases do ciclo menstrual, uma vez que esse parâmetro não foi controlado. Variações ao longo do ciclo menstrual poderão resultar em diferentes modos de ação da leptina: um estudo recente demonstrou uma relação diferente entre os níveis circulantes de leptina e o consumo de produtos alimentares açucarados, consoante as diferentes fases do ciclo menstrual (Krishnan *et al.* 2016).

Tendo em consideração as crianças, não foram observadas diferenças significativas para a concentração de leptina salivar entre grupos de sensibilidade para o amargo. No entanto, em adultos, indivíduos com resposta mais elevada ao PROP (ST) apresentaram níveis mais elevados desta hormona na saliva. Wang *et al.*, (2014) observaram níveis de leptina circulante mais elevados em indivíduos que percebiam com maior intensidade o amargo do composto PTC (que se liga, tal como o PROP, ao recetor do gosto amargo TAS2R38), sendo dos poucos estudos a referir uma possível associação entre níveis de leptina e resposta ao gosto amargo. Ainda que em faixas etárias diferentes, faz algum sentido que os níveis de leptina se relacionem de forma oposta com os gostos doce e amargo. Os gostos doce e amargo resultam em reações comportamentais opostas: enquanto que o doce potencia o consumo de alimentos, o amargo é dissuasor do mesmo (Fábián *et al.* 2015). Uma vez que a leptina é uma hormona envolvida na saciedade (Klok *et al.* 2007), é compreensível a existência de uma relação positiva entre os níveis desta hormona e a perceção do amargo, visto que o aumento da perceção deste gosto pode resultar numa menor aceitação dos alimentos. No entanto, a maioria dos estudos não observou um efeito da leptina na perceção do gosto amargo (Meredith *et al.* 2015; Yoshida *et al.* 2013), referindo a ausência de efeitos, por parte desta hormona, ao nível dos gomos gustativos. No entanto, sabe-se que esta hormona exerce uma ação considerável na regulação da ingestão de alimentos ao nível do sistema nervoso central (Klok *et al.* 2007), pelo que uma ação indireta da leptina na perceção do gosto amargo não é de excluir. Neste trabalho, não foi possível confirmar se as diferenças observadas entre grupos de resposta ao PROP foram devido à ação central ou periférica da leptina, sendo que mais estudos são necessários para elucidar esta questão. Além disso, os estudos referidos anteriormente avaliaram o efeito de outros compostos amargos, que não o PROP, sendo que diferentes compostos podem ativar recetores gustativos diferentes, resultando em respostas distintas (Roura *et al.* 2015). Este possível diferente efeito da leptina em diferentes recetores gustativos também é uma hipótese válida para tentar justificar o facto da relação entre os níveis salivares desta hormona e o gosto amargo ter sido observada apenas em adultos. A sensibilidade gustativa para o amargo, em crianças, foi avaliada com base na sua

reposta à cafeína, uma substância que ativa recetores do gosto amargo diferentes daqueles que são ativados pelo PROP (Meyerhof *et al.* 2010). Num estudo recente, Lipchock *et al.* (Lipchock *et al.* 2013) não encontraram relação entre a percepção gustativa para os compostos PROP e cafeína.

9.5. CONCLUSÃO

O presente estudo foi delineado para testar a hipótese de que os níveis salivares de leptina podem estar relacionados a percepção gustativa, tanto em crianças como em adultos. A principal conclusão deste trabalho é a de que os níveis salivares de leptina se relacionam quer com o gosto doce, quer com o gosto amargo, sendo essa relação dependente da faixa etária e, principalmente do sexo. Há ainda a hipótese da relação entre leptina e gosto amargo, que é referida em diversos estudos como inexistente, depender do tipo de composto que provoca o amargo. É importante realçar que esta relação só se observou para indivíduos normoponderais, sugerindo que os mecanismos de ação da leptina, na sensibilidade gustativa, possam estar alterados em indivíduos com excesso de peso. Neste trabalho há a limitação de não serem conhecidos os valores de leptina plasmática, o que dificulta o poder tirar conclusões. Também o conhecimento dos níveis de outras hormonas, nomeadamente hormonas sexuais, poderia ajudar a compreender as diferenças entre sexos. Ainda assim, estes resultados são relevantes porque, pela primeira vez, mostram que a presença de leptina na saliva está associada à percepção gustativa, suportando a hipótese da leptina salivar atuar diretamente nas estruturas recetoras do gosto. No entanto, esta hipótese terá que ser testada em estudos futuros.

Capítulo 10

Discussão geral, conclusões e perspectivas futuras

O potencial envolvimento da saliva na percepção dos alimentos foi sempre assumido, mesmo que de uma forma empírica, pelo facto deste fluido banhar as estruturas e os tecidos orais e contactar diretamente com os alimentos. No entanto, um olhar científico acerca de uma sua ação mais concreta na percepção oral mereceu mais atenção com a identificação de uma proteína associada ao desenvolvimento dos gomos gustativos (Henkin *et al.* 1975; inicialmente denominada gustina, que se identificou ser a anidrase carbónica VI) e com a compreensão de que a adstringência se deve à interação de proteínas salivares com polifenóis e outras moléculas adstringentes (Lu & Bennick, 1998). Por outro lado, avanços na área da proteómica contribuíram para aumentar substancialmente o conhecimento acerca da componente proteica deste fluido, embora só mais recentemente tenham surgido estudos que a relacionaram com a percepção do gosto (ex. Cabras *et al.*, 2012; Dsamou *et al.*, 2012; Morzel *et al.*, 2014). No entanto, estes estudos apenas apresentaram resultados para a sensibilidade para o gosto amargo, ficando a faltar compreender, não só, se diferentes compostos amargos se relacionam da mesma forma com a composição salivar, como também se essa relação se estende a outros gostos e/ou se é influenciada por fatores como sexo, faixa etária e índice de massa corporal (IMC).

No sentido de dar resposta a estas questões, que se resumem no objetivo geral deste trabalho, e que foi o de avaliar de que forma a composição da saliva se relaciona com os gostos amargo e doce, foram realizados estudos com base em dois ensaios principais:

1) um, realizado com jovens adultos (18-30 anos), onde a resposta ao composto PROP [geralmente referido como “marcador” de sensibilidade para gostos e sensações orais (Tepper, 2008)] e a sensibilidade ao gosto doce foram avaliadas, juntamente com a avaliação de parâmetros antropométricos e da composição salivar;

2) outro, realizado com crianças (8-9 anos) onde se avaliaram as sensibilidades ao gosto amargo da cafeína (não se testou o composto PROP por questões éticas) e ao gosto doce da sacarose, e se analisaram os mesmos parâmetros referidos para o ensaio com jovens adultos.

O motivo pelo qual foram escolhidos os gostos amargo e doce para o presente estudo prendeu-se com o facto de serem ambos gostos para os quais a sensibilidade tem sido relacionada com a aceitação, preferência e escolha dos alimentos (Tepper *et*

al., 2008; Morzel *et al.*, 2014), e, neste contexto, investigação acerca dos mecanismos que influenciam essa sensibilidade pode ser relevante na área nutricional. Por outro lado, e apesar de apresentarem mecanismos de transdução de sinal semelhantes (Margolskee, 2002), estes são gostos que desencadeiam respostas inatas opostas: o doce está associado a aceitação e prazer, enquanto o amargo está associado a rejeição e aversão (Tepper *et al.*, 2009; Swithers *et al.*, 2010).

O presente capítulo está dividido em 3 partes. Primeiro, os dados obtidos ao longo dos vários capítulos são comparados entre si e discutidos de uma forma integrada. A segunda parte apresenta as principais conclusões. Finalmente, numa terceira parte, serão discutidas as implicações que os resultados deste estudo poderão ter nas áreas alimentar e de saúde, bem como apresentadas propostas de trabalho a realizar no futuro.

10.1. Discussão geral

A influência da idade na sensibilidade gustativa tem sido investigada em diversos estudos, os quais referem diferenças entre crianças e adultos (James *et al.*, 1997; Mennella *et al.*, 2005). Neste trabalho, a sensibilidade gustativa foi avaliada em crianças e adultos jovens. Relativamente ao gosto amargo, não é possível comparar crianças e adultos pois a sensibilidade para este gosto foi avaliada através de diferentes metodologias em adultos (determinação de limiar de tolerância) e crianças (determinação de limiar de deteção), por questões éticas, de não utilização de PROP em crianças. Grande parte dos autores referem maior sensibilidade para o gosto amargo em crianças e adultos jovens, comparativamente a adultos (Mennella *et al.* 2005; Yoshinaka *et al.* 2015).

Relativamente ao gosto doce, foi observada uma percentagem mais elevada de crianças pouco sensíveis, comparativamente a sensíveis, enquanto nos adultos a percentagem de indivíduos sensíveis e pouco sensíveis a este gosto foi muito semelhante. Estudos anteriores reportam que, relativamente ao gosto doce, as crianças vivem num “mundo sensorial” diferente dos adultos (Mennella *et al.*, 2016). No entanto, há alguma controvérsia, com alguns autores a defenderem que as crianças são mais sensíveis ao gosto doce (Mojet *et al.*, 2001) e outros a não observarem diferenças (Joseph *et al.*, 2016).

A maioria dos estudos que avaliaram alterações na sensibilidade gustativa em função da idade, fizeram-no comparando a sensibilidade em adultos jovens (idade

média de 26 anos), adultos (até 70 anos) e idosos (70-90 anos), tendo sido observada uma diminuição da sensibilidade gustativa com a idade, para os gostos doce (Schiffman, 1993), amargo (Nordin *et al.*, 2003; Heft & Robinson, 2010), salgado (Yamauchi *et al.*, 2002; Wardwell *et al.*, 2009) e ácido (Yamauchi *et al.*, 2002; Heft & Robinson, 2010). Para o gosto doce foi observada uma diminuição da percepção mais acentuada entre adultos e idosos, enquanto para o amargo, o declínio na sensibilidade foi mais acentuado entre adultos jovens e adultos, podendo tal ser resultado da maior ingestão de alimentos amargos em idade adulta (Yoshinaka *et al.*, 2015).

O estudo da relação entre sensibilidade gustativa e composição da saliva, feito em separado para os dois gostos básicos avaliados, faz sentido quando se observa que a sensibilidade para estes dois gostos não está correlacionada. Ainda que nalguns indivíduos (quer em adultos, quer em crianças) se tenham observado sensibilidades semelhantes para os dois tipos de gosto, em grande parte isso não aconteceu, assinalando-se muitos indivíduos sensíveis para o doce e pouco sensíveis para o amargo, e vice-versa. Durante muito tempo as diferenças inter-individuais na percepção oral foram estudadas com base nos níveis de percepção dos compostos feniltiocarbamida (PTC) e 6-n-propil-tiouracil (PROP). A sensibilidade para estes compostos foi durante muito tempo considerada como marcador da sensibilidade oral para os diferentes gostos e sensações orais em geral (Tepper, 2008). No entanto, um número significativo de estudos questiona esta relação: Drewnowski *et al.* (1997) reportaram uma fraca associação entre a sensibilidade gustativa para o PROP e a percepção do gosto doce, estando de acordo com um estudo recente, no qual a relação entre a sensibilidade para este composto e a percepção dos restantes gostos básicos foi questionada (Nagai *et al.*, 2014). Ainda assim, continuam a existir estudos que referem a existência de uma correlação positiva entre os limiares de deteção do composto PROP e os limiares de deteção da sacarose (Chang *et al.*, 2006).

Não é completamente inesperado que o mesmo indivíduo apresente diferentes níveis de sensibilidade para os diferentes gostos. Tendo em consideração as vias de transdução de sinal, estas não são completamente idênticas para os diferentes gostos básicos. Apesar das vias de transdução dos gostos amargo e doce serem mediadas por recetores acoplados a proteína G, dependem de diferentes recetores de membrana, codificados por diferentes genes, sendo que variações nesses genes podem contribuir para variações na percepção dos diferentes gostos (Fushan *et al.*, 2009; Roudnitzky *et al.*, 2015). Para além disso, os hábitos alimentares podem influenciar a sensibilidade para os diversos gostos básicos (Ahrens *et al.*, 2015) e essa influencia pode não ser igual para todos eles (Akal *et al.*, 2003). No presente estudo, não foram avaliados os hábitos alimentares.

A sensibilidade gustativa é apontada como um dos fatores que influencia a aceitação, preferência e escolha dos alimentos, desempenhando um papel importante no desenvolvimento de doenças como a obesidade. Neste estudo, foi avaliada a relação entre a percepção dos gostos doce e amargo e o índice de massa corporal em adultos e crianças, tendo sido observado que, em ambos os grupos etários, indivíduos com excesso de peso apresentaram maior sensibilidade para o gosto amargo. Apesar dos resultados dos diferentes estudos existentes na bibliografia não serem consensuais, pois enquanto que uns não observaram associação entre a capacidade de resposta ao PROP e o IMC (Drewnowski *et al.*, 2007), outros observaram um IMC mais elevado em mulheres *nontaster* (Tepper *et al.*, 2008), podendo este aumento de sensibilidade para o gosto amargo em caso de obesidade, ser considerado um obstáculo para o consumo de alimentos mais saudáveis e tipicamente amargos, como os vegetais, conduzindo a escolhas alimentares mais calóricas. Efetivamente, neste trabalho observou-se que crianças obesas apresentaram menor preferência por diversos vegetais “amargos”, comparativamente às crianças normoponderais, o que está de acordo com outros estudos referidos na bibliografia (Bell & Tepper, 2006; Lanfer *et al.*, 2012). Também para os adultos, existem estudos que referem uma diminuição no consumo de vegetais amargos por parte de indivíduos sensíveis ao gosto amargo (Drewnowski *et al.*, 1999; Sandell *et al.*, 2014).

No presente trabalho, foi observado que a sensibilidade gustativa se relaciona com a composição da saliva, quer em adultos, quer em crianças, e tanto no que respeita ao gosto amargo, como no que respeita ao gosto doce. No entanto, e ainda que várias proteínas salivares estejam simultaneamente relacionadas com os dois tipos de gosto, nem sempre isso acontece, havendo variações específicas para cada um dos gostos estudados, sendo algumas dessas variações também dependentes da condição corporal e do sexo dos indivíduos. Até agora, a maioria dos estudos acerca do potencial envolvimento das proteínas salivares na percepção do gosto tinha-se focado principalmente no gosto amargo (Cabras *et al.*, 2012; Dsamou *et al.*, 2012; Melis *et al.*, 2013; Morzel *et al.*, 2014). Que seja do nosso conhecimento, este é o primeiro estudo que avalia a relação entre a composição da saliva e a percepção gustativa, tendo em consideração dois gostos básicos separadamente. Além disso, a maioria dos estudos em que esta relação é avaliada, foi feita em adultos, sendo escassos os estudos em crianças e a possível influência do IMC.

No presente trabalho foram observadas diferenças no proteoma salivar em função do sexo e em função do IMC, o que aponta para a importância de ter em conta estes fatores nos estudos da relação entre saliva e percepção oral. No que diz respeito ao fator sexo, quer em adultos, quer em crianças, foram observados aumentos nos

níveis de expressão de algumas formas de CA-VI, α -amilase e a cadeia leve de imunoglobulinas no sexo feminino. Destas, a cadeia leve de imunoglobulinas também foi referida, por outros autores, como estando aumentada na saliva de mulheres adultas (Fleissig *et al.*, 2010) e idosas (Narhi *et al.*, 1994), ainda que nalguns estudos esta diferença não tenha sido observada (Jafarzadeh *et al.*, 2010). No que diz respeito a diferenças entre indivíduos normoponderais e com excesso de peso, neste trabalho, uma comparação mais aprofundada só pôde ser feita no caso das crianças, pelo facto das amostras de adultos ter um número relativamente baixo de indivíduos com excesso de peso, dos quais o número de obesos era ainda mais reduzido. Ainda que os níveis de α -amilase tenham sido relacionados com a obesidade, quer em humanos (Lamy *et al.*, 2015), quer em modelos animais (Rodrigues *et al.*, 2015), no presente trabalho só um dos *spots* proteicos identificado como α -amílase foi observado com níveis de expressão mais elevados em crianças. Já as cadeias de imunoglobulinas, observadas diferencialmente expressas entre crianças normoponderais e com excesso de peso, estavam diminuídas neste último grupo, em concordância com os menores níveis de IgA salivar observados em crianças obesas por outros autores (Starzak *et al.*, 2016), o que pode estar associado a uma reduzida imunidade a nível da mucosa por parte das crianças obesas. A grande diferença entre os proteomas salivares de crianças normoponderais e crianças obesas observado no presente trabalho foi nos níveis de cistatinas. Estas diferenças, já discutidas no capítulo 7, podem ter duas explicações: por um lado, sendo estas proteínas maioritariamente originárias das glândulas submandibulares, a sua maior expressão poderá refletir uma maior atividade destas glândulas, ou, pelo menos, uma maior contribuição das mesmas, relativamente às outras glândulas salivares, para o total de proteínas salivares; por outro lado, esta maior expressão de cistatinas na saliva pode refletir os níveis de cistatinas plasmáticas mais elevados em obesos, que funcionam como reguladores de catepsinas que participam nos processos inflamatórios associados à lipogénese (Lafarge *et al.*, 2010).

Um dos aspetos mais relevantes observado neste trabalho, diz respeito ao facto de muitas das proteínas salivares que se encontram relacionadas com a perceção do gosto amargo estarem também relacionadas com a perceção do gosto doce. Isto observou-se tanto em adultos, como em crianças. A maioria das proteínas identificadas são de origem glandular [como a CA-VI, as cistatinas, a α -amilase e a proteína induzida por prolactina (PIP)], no entanto também se observaram proteínas provenientes de células epiteliais (como a actina e a zinco- α -2 glicoproteína) e do plasma sanguíneo (como a albumina) que passam para a saliva através do fluido crevicular gengival (Hardt *et al.*, 2005; Chiappin *et al.*, 2007; Culp *et al.*, 2011; Boehlke *et al.*, 2015). Das proteínas relacionadas com a sensibilidade gustativa destacam-se as cistatinas, a CA-VI, a α -

amilase, a PIP e as imunoglobulinas. Estas proteínas foram referidas em estudos anteriores como estando associadas à percepção do gosto amargo (Quintana *et al.*, 2009; Dsamou *et al.*, 2012; Morzel *et al.*, 2014). Que seja do nosso conhecimento, a sua possível relação com a sensibilidade para o gosto doce é referida pela primeira vez neste trabalho. Por outro lado, as proteínas zinco- α -2 glicoproteína e inibidor da elastase de leucócito observaram-se diferencialmente expressas apenas entre grupos de sensibilidade para o amargo em adultos e em adultos e crianças, respetivamente.

A proteína cistatina, identificada em estudos anteriores como estando associada ao gosto amargo, e que neste trabalho foi associada ao excesso de peso, também se observou estar relacionada com a sensibilidade para o gosto doce, tanto em adultos como em crianças. Apesar de alguns estudos referirem níveis de cistatinas salivares mais elevados em indivíduos pouco sensíveis ao gosto amargo do que em sensíveis (Dsamou *et al.*, 2012; Morzel *et al.*, 2013), no presente trabalho isso não se observou nem em adultos, nem em crianças. Curiosamente, em crianças algumas formas desta proteína apresentaram mesmo expressão significativamente mais elevada naquelas sensíveis ao gosto amargo. No entanto, uma tendência para níveis mais elevados em indivíduos pouco sensíveis foi observada em condições de excesso de peso, o que aponta para uma diferente relação desta proteína com a sensibilidade para o amargo em função do percentil de IMC. Isto reforça o facto da condição corporal dever ser tida em conta nos estudos relacionados com a percepção oral. Não menos curioso é o facto dos níveis de cistatinas salivares se relacionarem também com a sensibilidade para o gosto doce, mas de forma oposta em adultos e crianças. Enquanto nos primeiros são os indivíduos mais sensíveis a apresentar níveis de cistatinas mais elevados, nas crianças acontece o oposto. Foram observados níveis de cistatinas salivares mais elevados em adultos do que em crianças (Cabras *et al.*, 2009) e essas diferenças entre grupos etários pode resultar em diferentes relações entre estas proteínas e sensibilidade gustativa em adultos e crianças. O porquê da expressão ser diferente consoante o tipo de gosto, quando os mecanismos envolvidos na receção e transdução de sinal de ambos os gostos apresentam semelhanças, é algo que necessita de ser elucidado em estudos futuros.

A proteína PIP apresentou relação com as sensibilidades para ambos os gostos em adultos e crianças, embora seja para a sensibilidade ao gosto amargo que a expressão desta proteína varia no mesmo sentido nos dois grupos etários em estudo. Tanto em adultos como em crianças, a proteína PIP apresenta expressão significativamente mais elevada em indivíduos pouco sensíveis ao gosto amargo. Este resultado é concordante com os resultados apresentados por outros autores (Morzel *et*

al., 2014; Lorenz *et al.*, 2011), levando à hipótese que a secreção de PIP pode, de alguma forma, responder a sensações orais aversivas.

A proteína inibidora de elastase de leucócitos, apesar de até ao momento ainda não ter sido relacionada com a sensibilidade gustativa em outros estudos, neste trabalho apresentou relação com a sensibilidade para o gosto amargo, em adulto e crianças. Esta proteína apresenta como função regular a atividade de elastases de leucócitos (proteases presentes nos leucócitos que têm como função degradar a matriz extracelular) e outras proteases (Thompson *et al.*, 1986). À semelhança do que já foi referido para as cistatinas (também inibidores de proteases), níveis de expressão elevados desta proteína, na saliva dos indivíduos pouco sensíveis, podem estar relacionados com baixos níveis de proteólise, a qual pode afetar a película mucosa que reveste a cavidade oral, reduzindo a acessibilidade das moléculas do gosto para os respetivos recetores (Dsamou *et al.*, 2012).

A proteína zinco- α -2 glicoproteína foi observada como apresentando expressão diferencial apenas entre grupos de sensibilidade para o gosto amargo e apenas em adultos. Em crianças a expressão desta proteína não diferiu entre grupos de sensibilidade para ambos os gostos, ao contrário do que se observou num estudo recente (Morzel *et al.*, 2014). Inicialmente, a proteína zinco α -2 glicoproteína foi identificada em estudos que correlacionam a composição salivar com distúrbios no gosto (Igarashi *et al.* 2008), tendo sido observado uma diminuição da sua expressão em indivíduos com distúrbios no gosto, comparativamente a indivíduos saudáveis. Estudos posteriores associaram esta proteína com a sensibilidade para o gosto amargo, tendo sido demonstrado que a mesma se encontra presente em níveis mais elevados na saliva de crianças sensíveis ao amargo da ureia (Morzel *et al.*, 2014) e na saliva de adultos após estimulação com composto amargo (Lorenz *et al.*, 2011). Num estudo recente, Mounayar *et al.* (2014), demonstraram a relação desta proteína com a sensibilidade para o ácido oleico, estando a mesma presente em níveis mais elevados na saliva de indivíduos sensíveis a este (Mounayar *et al.*, 2014). Apesar de serem conhecidas várias funções biológicas desta proteína, como regulação da produção de melanina, mobilização de lípidos ou contribuição para a adesão celular (Hassan *et al.*, 2008), até ao momento, nenhuma se encontra relacionada com a perceção gustativa. O facto desta proteína estar associada à perceção do gosto amargo e da gordura, conduz à hipótese de considerar proteína sua participação na função gustativa. O papel desta proteína na ligação e transporte de vários ligandos, como lípidos, lipoproteínas e péptidos hidrofóbicos (Hassan *et al.*, 2008), sugere poder existir algum tipo de interação entre esta proteína e determinadas moléculas sápidas.

10.2. Conclusões gerais

Os resultados obtidos neste trabalho permitem concluir que apesar de existir uma relação entre a composição da saliva e a sensibilidade gustativa, essa relação depende do tipo de estímulo, mas também de fatores como a faixa etária, o sexo e condição corporal.

É de realçar que indivíduos com excesso de peso apresentaram alterações nos níveis de algumas proteínas salivares, as quais por sua vez, estão relacionadas com a sensibilidade para os gostos doce e amargo em indivíduos normoponderais, como é o caso das cistatinas e da amílase salivar.

Uma das sugestões decorrentes deste trabalho é a de que, para além da influência que algumas proteínas poderão ter na perceção gustativa, de forma individual, a influência da componente proteica poderá também passar pelas características que algumas proteínas assumem especificamente para as condições do meio onde estão. Nos capítulos 4, 5 e 7, ao separar as proteínas salivares por eletroforese bi-dimensional, foi possível observar uma tendência para os indivíduos do sexo masculino, menos sensíveis ao gosto amargo, apresentarem maiores níveis das isoformas de proteínas, como as cistatinas ou PIP, com ponto isoelétrico mais baixo. Também no caso do gosto doce parece haver uma relação entre a carga das proteínas que apresentaram maiores diferenças entre os grupos de sensibilidade. Neste caso, a tendência foi de maiores níveis de proteínas com pI próximo do pH da saliva estarem mais presentes nos indivíduos pouco sensíveis a este gosto, igualmente, apenas no caso dos indivíduos do sexo masculino. Estes resultados não foram muito discutidos ao longo da tese, por não se encontrarem, na bibliografia, estudos que suportem esta teoria. No entanto, é possível pensar que estes diferentes níveis de cargas elétricas possam influenciar algum tipo de complexação/agregação que afete o acesso das moléculas sápidas aos locais de receção dos gostos.

Ainda que muitos dos resultados obtidos na presente tese nos coloquem, de um modo geral, mais questões, eles representam um ponto de partida para melhor compreender o papel que a saliva pode ter na perceção gustativa e nas preferências alimentares - o que, por sua vez, poderá ajudar na compreensão das alterações que a perceção oral apresenta em condições de excesso de peso, contribuindo, assim, para uma maior compreensão dos mecanismos nela envolvidos.

10.3. Possíveis implicações na área alimentar e propostas de trabalho futuro

Sendo o gosto/paladar um dos principais sentidos potencialmente envolvido na percepção dos alimentos e conseqüentes escolhas alimentares, a compreensão dos mecanismos responsáveis por diferenças na capacidade de diferentes indivíduos perceberem este sentido tem relevância na área da nutrição/alimentação, quer a nível da produção e transformação de alimentos (indústria alimentar), quer a nível da saúde.

A existência de biomarcadores não invasivos de sensibilidade gustativa é potencialmente interessante na área da nutrição/alimentação, principalmente pelo facto dos métodos existentes para avaliar a percepção gustativa terem sempre algumas limitações em termos de objetividade (Zhao *et al.*, 2003). Os resultados apresentados ao longo da presente tese, ainda que não sejam suficientes para identificar um “biomarcador ideal” de sensibilidade gustativa, apresentam algumas proteínas salivares relacionadas com essa sensibilidade, o que poderá contribuir para a diferenciação dos indivíduos.

Por outro lado, a promoção de uma alimentação saudável, assente no conhecimento das características de cada indivíduo, em termos sensoriais e de preferências, terá, muito provavelmente, mais sucesso do que campanhas para impedir o consumo de alguns tipos de alimentos, sem ter em conta as preferências inatas. Nesse sentido, a relação entre percepção gustativa, preferências, escolhas alimentares e desenvolvimento de obesidade tem sido alvo de interesse por diversos autores (revisto em Tepper *et al.*, 2014). Os resultados obtidos no presente trabalho, nas populações estudadas (adultos e crianças), vão ao encontro dos obtidos por outros autores, que referem que uma menor sensibilidade para o gosto amargo permite uma maior aceitação e consumo de vegetais, logo uma dieta menos calórica (Bell & Tepper, 2006; Sandell *et al.*, 2014). A maior percentagem de indivíduos sensíveis ao amargo, observada nos grupos com excesso de peso (quer em adultos, quer em crianças) é suportada por uma menor preferência por vegetais (no caso das crianças). No entanto, com os dados deste trabalho, não conseguimos mostrar que são as diferenças na sensibilidade que conduzem a diferenças nas preferências ou mesmo se essas diferenças resultam num maior ganho de peso. Seria necessário conhecer os hábitos alimentares (parâmetro que não foi avaliado no presente estudo), para avaliar a relação entre percepção gustativa e consumo e seria necessário, também, conhecer melhor os estilos de vida, nomeadamente a quantidade de energia despendida, uma vez que esta, em paralelo com a ingestão, também condiciona o peso corporal.

Um resultado que poderá ser relevante, numa perspetiva de estimular a preferência por vegetais e de os introduzir nas dietas habituais das crianças, é o facto das preferências para os mesmos não estarem só relacionadas com a sensibilidade para o gosto amargo, mas também com a sensibilidade para o gosto doce. Este resultado reforça a importância de conhecer as características sensoriais individuais e de atuar individualmente, para promover aceitação e preferência por alimentos saudáveis.

O comportamento e os hábitos alimentares e a sua associação com o tempo despendido face à TV e a publicidade sobre alimentos tem sido referida por diversos autores (Coon *et al.*, 2001; Viana *et al.*, 2008; Lissner *et al.*, 2012). As evidências que mostram que assistir à TV durante as refeições está associada a menores preferências por alimentos menos calóricos é importante no sentido de adotar medidas relativamente a este hábito. Um dos motivos poderá ser a menor atenção prestada às características sensoriais dos alimentos, pela atenção dada à TV (Lissner *et al.*, 2012), pelo que será importante sensibilizar educadores e/ou arranjar estratégias para que as refeições sejam momentos de experiências sensoriais. É cada vez mais referido que o contacto repetido com um estímulo (e de forma consciente) aumenta a sua preferência (Wardle *et al.*, 2003).

Tal como referido para a compreensão das variações na sensibilidade gustativa e nas preferências, será importante, no futuro, avaliar os hábitos alimentares. Com os dados de que dispomos, não é possível saber se algumas das diferenças observadas na composição proteica da saliva estão diretamente relacionadas com a perceção oral, ou, indiretamente, devido a alterações derivadas dos hábitos alimentares. Determinados tipos de dieta parecem induzir diferentes proteínas, como as cistatinas (Katsukawa & Ninomiya, 1999), e a amílase salivar (Perry *et al.*, 2007; da Costa *et al.*, 2008).

Por fim, os resultados apresentados nos capítulos 8 e 9 necessitam ser mais aprofundados em estudos futuros. No caso das diferenças nos níveis de cortisol salivar de acordo com o IMC e a sensibilidade gustativa, para além dos níveis num determinado ponto, seria interessante conhecer a resposta a *stress* agudo destes indivíduos. Principalmente no caso da obesidade, há estudos que apontam no sentido de maiores níveis de *stress* (*stress* crónico) estarem na base do ganho de peso (Dallman *et al.*, 2003). Até ao momento, a relação entre os níveis de cortisol e a sensibilidade gustativa tem sido pouco explorada. Apenas um estudo recente demonstrou que o aumento dos níveis de cortisol, após a exposição ao *stress*, parece estar associado a uma diminuição da intensidade percebida dos gostos salgado e ácido (Al'Absi *et al.*, 2012). A maioria dos estudos que relacionaram os níveis de bioindicadores de *stress* com o

comportamento alimentar, foram desenvolvidos tendo em conta apenas o consumo e as escolhas alimentares dos indivíduos em estudo (Järvelä-Reijonen *et al.*, 2016), tendo alguns demonstrado que a administração de cortisol conduziu a um aumento da ingestão de alimentos mais calóricos (Epel *et al.*, 2001). No caso particular deste trabalho, mesmo sem indução de algum tipo de *stress* agudo, a sensibilidade gustativa relacionou-se com os níveis de cortisol salivar. Estudos futuros deverão ser realizados no sentido de elucidar até que ponto é que a mesma poderá condicionar as preferências e escolhas alimentares.

Finalmente, no caso da relação entre níveis de leptina e sensibilidade gustativa, que seja do nosso conhecimento, este é o primeiro trabalho que mostra que os níveis salivares estão relacionados com a sensibilidade gustativa. No entanto, são necessários estudos que mostrem se é a leptina salivar que atua diretamente nas células recetoras do gosto, modulando a sua ação, ou se estes níveis salivares apenas refletem os níveis circulantes desta hormona, sendo a sua ação sistémica.

Investigação na área salivar, em combinação com estudos na área sensorial, nutrição e mesmo estudos epidemiológicos, poderão ajudar a elucidar as especificidades individuais e os mecanismos que estão na base das preferências, ajudando a perceber melhor a complexidade das escolhas e dos comportamentos alimentares.

Capítulo 11
Referências bibliográficas

- Abraham, S. B., Rubino, D., Sinaii, N., Ramsey, S., & Nieman, L. K. (2013). Cortisol, obesity, and the metabolic syndrome: A cross-sectional study of obese subjects and review of the literature. *Obesity*, 21(1), E105-E117.
- Ahrens, W. (2015). Sensory taste preferences and taste sensitivity and the association of unhealthy food patterns with overweight and obesity in primary school children in Europe—a synthesis of data from the IDEFICS study. *Flavour*, 4(1), 1.
- Antras, J., Hilliou, F., Redziniak, G., & Pairault, J. (1989). Decreased biosynthesis of actin and cellular fibronectin during adipose conversion of 3T3-F442A cells. Reorganization of the cytoarchitecture and extracellular matrix fibronectin. *Biology of the Cell*, 66(3), 247-254.
- Akal, U. K., Delilbasi, C., Yilmaz, T., Redzep, E., & Sertkaya, D. (2003). Evaluation of some factors affecting taste perception. *Oral Health and Dental Management*, 2(4):32-37
- Akella, G. D., Henderson, S. A., & Drewnowski, A. (1997). Sensory acceptance of Japanese green tea and soy products is linked to genetic sensitivity to 6-n-propylthiouracil.
- Al'absi, M., Nakajima, M., Hooker, S., Wittmers, L., & Cragin, T. (2012). Exposure to acute stress is associated with attenuated sweet taste. *Psychophysiology*, 49(1), 96-103.
- Ali, N., & Pruessner, J. C. (2012). The salivary alpha amylase over cortisol ratio as a marker to assess dysregulations of the stress systems. *Physiology & behavior*, 106(1), 65-72.
- Al-Tarawneh, S. K., Border, M. B., Dibble, C. F., & Bencharit, S. (2011). Defining salivary biomarkers using mass spectrometry-based proteomics: a systematic review. *Omics: a journal of integrative biology*, 15(6), 353-361.
- Amado, F. M., Ferreira, R. P., & Vitorino, R. (2013). One decade of salivary proteomics: current approaches and outstanding challenges. *Clinical biochemistry*, 46(6), 506-517.
- Anderson, G. H. (1995). Sugars, sweetness, and food intake. *The American journal of clinical nutrition*, 62(1), 195S-201S.
- Aps, J.K., Martens, L.C. (2005). Review: The physiology of saliva and transfer of drugs into Saliva. *Forensic Sci Int*, 150: 119-31.
- Argente, J., Barrios, V., Chowen, J. A., Sinha, M. K., & Considine, R. V. (1997). Leptin plasma levels in healthy Spanish children and adolescents, children with obesity, and adolescents with anorexia nervosa and bulimia nervosa. *The Journal of pediatrics*, 131(6), 833-838.
- Aydin S, Halifeoglu İ, Ozercan İH, Erman F, Kilic N, Aydin S, et al. A comparison of

leptin and ghrelin levels in plasma and saliva of young healthy subjects. *Peptides*. 2005;26(4):647–52.

Bachmanov, A. A., Bosak, N. P., Lin, C., Matsumoto, I., Ohmoto, M., Reed, D. R., & Nelson, T. M. (2014). Genetics of taste receptors. *Current Pharmaceutical Design*, 20(16), 2669–83.

Baile, C. A., Della-Fera, M. A., & Martin, R. J. (2000). Regulation of metabolism and body fat mass by leptin. *Annual review of nutrition*, 20(1), 105-127.

Bajec, M. R., & Pickering, G. J. (2008). Astringency: mechanisms and perception. *Critical reviews in food science and nutrition*, 48(9), 858-875.

Bandhakavi, S., Stone, M. D., Onsongo, G., Van Riper, S. K., & Griffin, T. J. (2009). A dynamic range compression and three-dimensional peptide fractionation analysis platform expands proteome coverage and the diagnostic potential of whole saliva. *Journal of proteome research*, 8(12), 5590-5600.

Barat, P., Gayard-Cros, M., Andrew, R., Corcuff, J. B., Jouret, B., Barthe, N., ... & Mormede, P. (2007). Truncal distribution of fat mass, metabolic profile and hypothalamic-pituitary adrenal axis activity in prepubertal obese children. *The Journal of pediatrics*, 150(5), 535-539.

Barbarossa, I. T., Melis, M., Mattes, M. Z., Calò, C., Muroi, P., Crnjar, R., & Tepper, B. J. (2015). The gustin (CA6) gene polymorphism, rs2274333 (A/G), is associated with fungiform papilla density, whereas PROP bitterness is mostly due to TAS2R38 in an ethnically-mixed population. *Physiology & Behavior*, 138, 6–12. doi:10.1016/j.physbeh.2014.09.011

Baron, A. C., DeCarlo, A. A., & Featherstone, J. D. B. (1999). Functional aspects of the human salivary cystatins in the oral environment. *Oral diseases*, 5(3), 234-240.

Bartoshuk, L. M., Conner, E., Grubin, D., Karrer, T., Kochenbach, K., Palcso, M., ... & Danowski, S. (1993). PROP supertasters and the perception of ethyl alcohol. *Chem Senses*, 18, 526-527.

Bartoshuk, L. M., Duffy, V. B., & Miller, I. J. (1994). PTC/PROP tasting: anatomy, psychophysics, and sex effects. *Physiology & behavior*, 56(6), 1165-1171.

Bartoshuk, L. M., Duffy, V. B., Hayes, J. E., Moskowitz, H. R., & Snyder, D. J. (2006). Psychophysics of sweet and fat perception in obesity: problems, solutions and new perspectives. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 361(1471), 1137-1148.

- Beauchamp, G. K., & Cowart, B. J. (1987). Development of sweet taste. In *Sweetness* (pp. 127-140). Springer London.
- Bell, K.I. & B.J. Tepper. (2006). Short-term vegetable intake by young children classified by 6-npropylthiouracil bitter-taste phenotype. *Am. J. Clin. Nutr*, 84: 245–251.
- Bellisle, F. (2009). How and why should we study ingestive behaviors in humans? *Food quality and preference*, 20(8), 539-544.
- Ben-Aryeh, H., Fisher, M., Szargel, R., & Laufer, D. (1990). Composition of whole unstimulated saliva of healthy children: changes with age. *Archives of Oral biology*, 35(11), 929-931.
- Besnard, P., Passilly-Degrace, P., & Khan, N. A. (2016). Taste of fat: a sixth taste modality?. *Physiological reviews*, 96(1), 151-176.
- Birch, L. L. (1999). Development of food preferences. *Annual review of nutrition*, 19(1), 41-62.
- Blakeslee, A.F., Fox, A.L. (1932). Our different taste worlds. *J Hered*, 23:97– 107.
- Bobek, L. A., & Levine, M. J. (1992). Cystatins—inhibitors of cysteine proteinases. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 3(4), 307-332.
- Bobowski, N. K., & Mennella, J. A. (2015). Disruption in the relationship between blood pressure and salty taste thresholds among overweight and obese children. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*, 115, 1272–1282.
- Boehlke, C., Zierau, O., & Hannig, C. (2015). Salivary amylase—The enzyme of unspecialized euryphagous animals. *Archives of oral biology*, 60(8), 1162-1176.
- Booth, S. L., Sallis, J. F., Ritenbaugh, C., Hill, J. O., Birch, L. L., Frank, L. D., ... & Rickard, K. A. (2001). Environmental and societal factors affect food choice and physical activity: rationale, influences, and leverage points. *Nutrition reviews*, 59(3), S21-S36.
- Breslin, P. A. (2013). An evolutionary perspective on food and human taste. *Current Biology*, 23(9), R409-R418.
- Bretz, W. A., Corby, P. M., Melo, M. R., Coelho, M. Q., Costa, S. M., Robinson, M., ... & Hart, T. C. (2006). Heritability estimates for dental caries and sucrose sweetness preference. *Archives of oral biology*, 51(12), 1156-1160.
- Brillon, D. J., Zheng, B., Campbell, R. G., & Matthews, D. E. (1995). Effect of cortisol on energy expenditure and amino acid metabolism in humans. *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism*, 268(3), E501-E513.

- Bueno, J. R., & Gouvêa, C. M. C. P. (2011). Cortisol e exercício: efeitos, secreção e metabolismo. *Revista Brasileira de Prescrição e Fisiologia do Exercício (RBPFEEX)*, 5(29), 7.
- Bufe, B., Breslin, P. A., Kuhn, C., Reed, D. R., Tharp, C. D., Slack, J. P., ... & Meyerhof, W. (2005). The molecular basis of individual differences in phenylthiocarbamide and propylthiouracil bitterness perception. *Current Biology*, 15(4), 322-327.
- Butterworth, P. J., Warren, F. J., & Ellis, P. R. (2011). Human α -amylase and starch digestion: An interesting marriage. *Starch-Stärke*, 63(7), 395-405.
- Cabras, T., Pisano, E., Boi, R., Olianias, A., Manconi, B., Inzitari, R., ... & Messana, I. (2009). Age-dependent modifications of the human salivary secretory protein complex. *Journal of proteome research*, 8(8), 4126-4134
- Cabras, T., Pisano, E., Mastinu, A., Denotti, G., Pusceddu, P. P., Inzitari, R., ... & Messana, I. (2010). Alterations of the salivary secretory peptidome profile in children affected by type 1 diabetes. *Molecular & Cellular Proteomics*, 9(10), 2099-2108.
- Cabras, T., Melis, M., Castagnola, M., Padiglia, A., Tepper, B. J., Messana, I., & Tomassini Barbarossa, I. (2012). Responsiveness to 6-n-propylthiouracil (PROP) is associated with salivary levels of two specific basic proline-rich proteins in humans. *PLoS One*, 7(2), e30962. doi:10.1371/journal.pone.0030962
- Canon, F., Giuliani, A., Paté, F., & Sarni-Manchado, P. (2010). Ability of a salivary intrinsically unstructured protein to bind different tannin targets revealed by mass spectrometry. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 398(2), 815-822.
- Carpenter, G. H. (2013). The secretion, components, and properties of saliva. *Annual review of food science and technology*, 4, 267-276.
- Carrera, M., Gallardo, J. M., Pascual, S., González, Á. F., & Medina, I. (2016). Protein biomarker discovery and fast monitoring for the identification and detection of Anisakids by parallel reaction monitoring (PRM) mass spectrometry. *Journal of proteomics*, 142, 130-137.
- Carstens, E., Carstens, M. I., Dessirier, J. M., O'Mahony, M., Simons, C. T., Sudo, M., & Sudo, S. (2002). It hurts so good: oral irritation by spices and carbonated drinks and the underlying neural mechanisms. *Food Quality and Preference*, 13(7), 431-443.
- Castagnola, M., Inzitari, R., Fanali, C., Iavarone, F., Vitali, A., Desiderio, C., ... & Manconi, B. (2011). The surprising composition of the salivary proteome of preterm human newborn. *Molecular & Cellular Proteomics*, 10(1), M110-003467.

- Cate T.A.R. (1998). *Histologia Bucal, Desenvolvimento, Estrutura e Função*, 5ª edição.
- Champaneri, S., Xu, X., Carnethon, M. R., Bertoni, A. G., Seeman, T., DeSantis, A. S., ... & Golden, S. H. (2013). Diurnal salivary cortisol is associated with body mass index and waist circumference: the Multiethnic Study of Atherosclerosis. *Obesity*, *21*(1), E56-E63.
- Chandrashekar, J., Mueller, K.L., Hoon, M.A., Adler, E., Feng, L.X., Guo, W., Zuker, C.S., Ryba, N.J.P. (2000). T2Rs function as bitter taste receptors. *Cell*, *100*:703-711.
- Chandrashekar, J., Hoon, M. A., Ryba, N. J., & Zuker, C. S. (2006). The receptors and cells for mammalian taste. *Nature*, *444*(7117), 288-294.
- Chang, W. I., Chung, J. W., Kim, Y. K., Chung, S. C., & Kho, H. S. (2006). The relationship between phenylthiocarbamide (PTC) and 6-n-propylthiouracil (PROP) taster status and taste thresholds for sucrose and quinine. *Archives of Oral Biology*, *51*(5), 427-432.
- Chiappin, S., Antonelli, G., Gatti, R., & Elio, F. (2007). Saliva specimen: a new laboratory tool for diagnostic and basic investigation. *Clinica Chimica Acta*, *383*(1), 30-40.
- Clegg, D. J., Brown, L. M., Woods, S. C., & Benoit, S. C. (2006). Gonadal hormones determine sensitivity to central leptin and insulin. *Diabetes*, *55*(4), 978-987. Curtis KS, Stratford JM. Estrogen increases the taste threshold for sucrose in rats. *Physiol. Behav.* 2005;*86*(3):281–6.
- Cohen, T., & Gitman, L. (1959). Oral complaints and taste perception in the aged. *Journal of gerontology*, *14*(3), 294-298.
- Collomp, K., Baillot, A., Forget, H., Coquerel, A., Rieth, N., & Vibarel-Rebot, N. (2016). Altered diurnal pattern of steroid hormones in relation to various behaviors, external factors and pathologies: A review. *Physiology & behavior*, *164*, 68-85. doi: 10.1016/j.physbeh.2016.05.039. Epub 2016 May 24.
- Consultas de vigilância de saúde infantil e juvenil – Atualização das curvas de crescimento. (2006). Direção geral de saúde. Circular Normativa N.º: 05/DSMIA.
- Contento, I. R. (2007). *Nutrition education: linking research, theory, and practice*. Jones & Bartlett Learning. Chapter 2.
- Coon, K. A., Goldberg, J., Rogers, B. L., & Tucker, K. L. (2001). Relationships between use of television during meals and children's food consumption patterns. *Pediatrics*, *107*(1), e7-e7.

- Cooper, R. M., Bilash, I., & Zubek, J. P. (1959). The effect of age on taste sensitivity. *Journal of Gerontology*.
- Culp, D. J., Robinson, B., Parkkila, S., Pan, P. W., Cash, M. N., Truong, H. N., ... & Gullett, S. L. (2011). Oral colonization by *Streptococcus mutans* and caries development is reduced upon deletion of carbonic anhydrase VI expression in saliva. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1812(12), 1567-1576.
- Curtis, K. S., Davis, L. M., Johnson, A. L., Therrien, K. L., & Contreras, R. J. (2004). Sex differences in behavioral taste responses to and ingestion of sucrose and NaCl solutions by rats. *Physiology & behavior*, 80(5), 657-664.
- Curtis, K. S., Stratford, J. M., & Contreras, R. J. (2005). Estrogen increases the taste threshold for sucrose in rats. *Physiology & behavior*, 86(3), 281-286.
- Da Costa, G., Lamy, E., Capela e Silva, F., Sales Baptista, E., & Coelho, A. (2008). Salivary amylase induction by tannin-enriched diets as a possible countermeasure against tannins. *Journal Chemistry Ecology*, 34:376-387.
- Dahiya, P., Kamal, R., & Gupta, R. (2012). Obesity, periodontal and general health: Relationship and management. *Indian journal of endocrinology and metabolism*, 16(1), 88.
- Dakna, M., He, Z., Yu, W. C., Mischak, H., & Kolch, W. (2009). Technical, bioinformatical and statistical aspects of liquid chromatography–mass spectrometry (LC–MS) and capillary electrophoresis-mass spectrometry (CE-MS) based clinical proteomics: A critical assessment. *Journal of Chromatography B*, 877(13), 1250-1258.
- Dallman, M. F., Pecoraro, N., Akana, S. F., La Fleur, S. E., Gomez, F., Houshyar, H., ... & Manalo, S. (2003). Chronic stress and obesity: a new view of “comfort food”. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(20), 11696-11701.
- Dallman, M. F., Pecoraro, N. C., & la Fleur, S. E. (2005). Chronic stress and comfort foods: self-medication and abdominal obesity. *Brain, behavior, and immunity*, 19(4), 275-280.
- Dallman, M. F. (2010). Stress-induced obesity and the emotional nervous system. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 21(3), 159-165.
- Dasso, M., Pagotto, R., Pignataro, O. P., Diez, R. A., & Sales, M. E. (2011). Effect of bitter compounds on amylase secretion in murine submandibular glands: Signaling pathway mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1810(12), 1212-1219.

- de Freitas, V., & Mateus, N. (2001). Structural features of procyanidin interactions with salivary proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(2), 940-945.
- de Freitas, V., & Mateus, N. (2002). Nephelometric study of salivary protein–tannin aggregates. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82(1), 113-119.
- de Sousa-Pereira, P., Amado, F., Abrantes, J., Ferreira, R., Esteves, P. J., & Vitorino, R. (2013). An evolutionary perspective of mammal salivary peptide families: cystatins, histatins, statherin and PRPs. *Archives of oral biology*, 58(5), 451-458.
- Delwiche, J. F., Buletic, Z., & Breslin, P. A. (2001). Relationship of papillae number to bitter intensity of quinine and PROP within and between individuals. *Physiology & Behavior*, 74(3), 329-337.
- de Wijk, R. A., & Prinz, J. F. (2006). Mechanisms underlying the role of friction in oral texture. *Journal of Texture Studies*, 37(4), 413-427.
- Dietrich, A., Ormel, J., Buitelaar, J. K., Verhulst, F. C., Hoekstra, P. J., & Hartman, C. A. (2013). Cortisol in the morning and dimensions of anxiety, depression, and aggression in children from a general population and clinic-referred cohort: an integrated analysis. The TRAILS study. *Psychoneuroendocrinology*, 38(8), 1281-1298.
- Dinehart, M. E., Hayes, J. E., Bartoshuk, L. M., Lanier, S. L., & Duffy, V. B. (2006). Bitter taste markers explain variability in vegetable sweetness, bitterness, and intake. *Physiology & Behavior*, 87(2), 304-313.
- Dinnella, C., Recchia, A., Fia, G., Bertuccioli, M., & Monteleone, E. (2009). Saliva characteristics and individual sensitivity to phenolic astringent stimuli. *Chemical senses*, bjp003.
- Dinnella, C., Recchia, A., Vincenzi, S., Tuorila, H., & Monteleone, E. (2010). Temporary modification of salivary protein profile and individual responses to repeated phenolic astringent stimuli. *Chemical senses*, 35(1), 75-85.
- Donaldson, L. F., Bennett, L., Baic, S., & Melichar, J. K. (2009). Taste and weight: is there a link?. *The American journal of clinical nutrition*, 90(3), 800S-803S.
- Douglas C.R. (2002). *Tratado de Fisiologia Aplicado à Saúde*, 5ª edição.
- Dreisewerd, K. (2003). "The desorption process in MALDI." *Chem Rev*, 103(2): 395-426.

- Drewnowski, A., Brunzell, J. D., Sande, K., Iverius, P. H., & Greenwood, M. R. C. (1985). Sweet tooth reconsidered: taste responsiveness in human obesity. *Physiology & Behavior*, 35(4), 617-622.
- Drewnowski, A., Grinker, J. A., & Hirsch, J. (1982). Obesity and flavor perception: multidimensional scaling of soft drinks. *Appetite*, 3(4), 361-8.
- Drewnowski, A., Henderson, S. A., & Shore, A. B. (1997). Genetic sensitivity to 6-n-propylthiouracil (PROP) and hedonic responses to bitter and sweet tastes. *Chemical Senses*, 22(1), 27-37.
- Drewnowski, A., Henderson, S. A., & Barratt-Fornell, A. (1998). Genetic sensitivity to 6-n-propylthiouracil and sensory responses to sugar and fat mixtures. *Physiology & behavior*, 63(5), 771-777.
- Drewnowski, A., Henderson, S. A., Levine, A., & Hann, C. (1999). Taste and food preferences as predictors of dietary practices in young women. *Public health nutrition*, 2(04), 513-519.
- Drewnowski, A., & Gomez-Carneros, C. (2000). Bitter taste, phytonutrients, and the consumer: a review. *The American journal of clinical nutrition*, 72(6), 1424-1435.
- Drewnowski, A., Henderson, S. A., & Cockcroft, J. E. (2007). Genetic sensitivity to 6-n-propylthiouracil has no influence on dietary patterns, body mass indexes, or plasma lipid profiles of women. *Journal of the American Dietetic Association*, 107(8), 1340-1348.
- Drewnowski, A., & Specter, S. E. (2004). Poverty and obesity: the role of energy density and energy costs. *The American journal of clinical nutrition*, 79(1), 6-16.
- Dsamou, M., Palicki, O., Septier, C., Chabanet, C., Lucchi, G., Ducoroy, P., ... & Morzel, M. (2012). Salivary protein profiles and sensitivity to the bitter taste of caffeine. *Chemical senses*, 37(1), 87-95.
- Duffy, V. B., & Bartoshuk, L. M. (2000). Food acceptance and genetic variation in taste. *Journal of the American Dietetic Association*, 100(6), 647-655.
- Duffy, V. B. (2007). Variation in oral sensation: implications for diet and health. *Current opinion in gastroenterology*, 23(2), 171-177.
- Emmelin N. (1987). Nerve interactions in salivary glands. *J Dent Res*, 66:509-517.

- Engelen, L., van den Keybus, P. A., de Wijk, R. A., Veerman, E. C., Amerongen, A. V. N., Bosman, F., ... & van der Bilt, A. (2007). The effect of saliva composition on texture perception of semi-solids. *archives of oral biology*, 52(6), 518-525.
- Epel, E., Lapidus, R., McEwen, B., & Brownell, K. (2001). Stress may add bite to appetite in women: a laboratory study of stress-induced cortisol and eating behavior. *Psychoneuroendocrinology*, 26(1), 37-49.
- Epstein, L. H., Roemmich, J. N., Robinson, J. L., Paluch, R. A., Winiewicz, D. D., Fuerch, J. H., & Robinson, T. N. (2008). A randomized trial of the effects of reducing television viewing and computer use on body mass index in young children. *Archives of pediatrics & adolescent medicine*, 162(3), 239-245.
- Everson, S. A., Maty, S. C., Lynch, J. W., & Kaplan, G. A. (2002). Epidemiologic evidence for the relation between socioeconomic status and depression, obesity, and diabetes. *Journal of psychosomatic research*, 53(4), 891-895.
- Fábián, T. K., Gótai, L., Beck, A., Fábián, G., & Fejérdy, P. (2009). The role of molecular chaperones (HSPAs/HSP70s) in oral health and oral inflammatory diseases: A review. *Eur. J. Inflamm*, 7, 53-61.
- Fábián, T. K., Beck, A., Fejérdy, P., Hermann, P., & Fábián, G. (2015). Molecular mechanisms of taste recognition: considerations about the role of saliva. *International journal of molecular sciences*, 16(3), 5945-5974.
- Feeney, E. L., & Hayes, J. E. (2014). Exploring associations between taste perception, oral anatomy and polymorphisms in the carbonic anhydrase (gustin) gene CA6. *Physiology & Behavior*, 128, 148–54. doi:10.1016/j.physbeh.2014.02.013
- Faas, M. M., Melgert, B. N., & de Vos, P. (2010). A brief review on how pregnancy and sex hormones interfere with taste and food intake. *Chemosensory perception*, 3(1), 51-56.
- Felsted J, O'Malley S, Nachtigal D, Gant P, Small D. (2007). Relationships between BMI, perceived pleasantness and ad lib consumption of food in smokers and non-smokers. In: List of Abstracts from the Twenty-ninth Annual Meeting of the Association for Chemoreception Sciences. *Chem Senses*, 32:A17 (abstr)
- Fleissing, Y., Reichenberg, E., Redlich, M., Zaks, B., Deutsch, O., Aframian, D. J., & Palmon, A. (2010). Comparative proteomic analysis of human oral fluids according to gender and age. *Oral diseases*, 16(8), 831-838.

- Formosinho, J. (1987). A Influência dos factores sociais. In *O insucesso escolar em questão*, Cadernos de análise social da educação, Área de análise social e Organizacional da educação, 23-27.
- Fox, A. L. (1932). The relationship between chemical constitution and taste. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 18(1), 115-120.
- Francis, C. A., Hector, M. P., & Proctor, G. B. (2000). Precipitation of specific proteins by freeze-thawing of human saliva. *Archives of oral biology*, 45(7), 601-606.
- Freedman, D. S., Khan, L. K., Mei, Z., Dietz, W. H., Srinivasan, S. R., & Berenson, G. S. (2002). Relation of childhood height to obesity among adults: the Bogalusa Heart Study. *Pediatrics*, 109(2), e23-e23.
- Friedman, J. M., & Halaas, J. L. (1998). Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature*, 395(6704), 763-770.
- Friedman, D. B., Hoving, S., & Westermeier, R. (2009). Isoelectric focusing and two-dimensional gel electrophoresis. *Methods in enzymology*, 463, 515-540.
- Friedman, M. I., & Stricker, E. M. (1976). The physiological psychology of hunger: a physiological perspective. *Psychological review*, 83(6), 409.
- Fukunaga, A., Uematsu, H., & Sugimoto, K. (2005). Influences of aging on taste perception and oral somatic sensation. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, 60(1), 109-113.
- Furquim, T. R. D., Poli-Frederico, R. C., Maciel, S. M., Gonini-Júnior, A., & Walter, L. R. F. (2010). Sensitivity to bitter and sweet taste perception in schoolchildren and their relation to dental caries. *Oral Health Prev Dent*, 8(3), 253-9.
- Fushan, A. A., Simons, C. T., Slack, J. P., Manichaikul, A., & Drayna, D. (2009). Allelic polymorphism within the TAS1R3 promoter is associated with human taste sensitivity to sucrose. *Current Biology*, 19(15), 1288-1293.
- Fushan, A. A., Simons, C. T., Slack, J. P., & Drayna, D. (2010). Association between common variation in genes encoding sweet taste signaling components and human sucrose perception. *Chemical senses*, bjq063.
- Gao, Q., & Horvath, T. L. (2008). Cross-talk between estrogen and leptin signaling in the hypothalamus. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 294(5), E817-E826.

- Garrett, J. R. (1987). The proper role of nerves in salivary secretion: a review. *Journal of Dental Research*, 66(2), 387-397.
- Genick, U. K., Kutalik, Z., Ledda, M., Destito, M. C. S., Souza, M. M., Cirillo, C. A., ... & Bergmann, S. (2011). Sensitivity of genome-wide-association signals to phenotyping strategy: the PROP-TAS2R38 taste association as a benchmark. *PloS one*, 6(11), e27745.
- Gidez, L. I. (1973). Effect of dietary fat on pancreatic lipase levels in the rat. *Journal of lipid research*, 14(2), 169-177.
- Gilbertson, T. A., Damak, S., & Margolskee, R. F. (2000). The molecular physiology of taste transduction. *Current opinion in neurobiology*, 10(4), 519-527.
- Gillum, T., Kuennen, M., Miller, T., & Riley, L. (2014). The effects of exercise, sex, and menstrual phase on salivary antimicrobial proteins. *Exerc. Immunol. Rev*, 20, 23-38.
- Glendinning, J. I. (1994). Is the bitter rejection response always adaptive. *Physiology & behavior*, 56(6), 1217-1227.
- Glendinning, J. I., Elson, A. E., Kalik, S., Sosa, Y., Patterson, C. M., Myers, M. G., & Munger, S. D. (2015). Taste responsiveness to sweeteners is resistant to elevations in plasma leptin. *Chemical senses*, 40(4), 223-231.
- Glanville, E. V., Kaplan, A. R., & Fischer, R. (1964). Age, sex and taste sensitivity. *Journal of Gerontology*, 19(4), 474-478.
- Gonçalves, L. D. R., Soares, M. R., Nogueira, F. C., Garcia, C., Camisasca, D. R., Domont, G., ... & Alves, G. (2010). Comparative proteomic analysis of whole saliva from chronic periodontitis patients. *Journal of proteomics*, 73(7), 1334-1341.
- Govorun, V. M. and A. I. Archakov (2002). "Proteomic technologies in modern biomedical science." *Biochemistry (Mosc)*, 67(10): 1109-23.
- Green, B. G., Dalton, P., Cowart, B., Shaffer, G., Rankin, K., & Higgins, J. (1996). Evaluating the 'Labeled Magnitude Scale' for measuring sensations of taste and smell. *Chemical senses*, 21(3), 323-334.
- Green, B. G., Shaffer, G. S., & Gilmore, M. M. (1993). Derivation and evaluation of a semantic scale of oral sensation magnitude with apparent ratio properties. *Chemical senses*, 18(6), 683-702.
- Groesz, L. M., McCoy, S., Carl, J., Saslow, L., Stewart, J., Adler, N., ... & Epel, E. (2012). What is eating you? Stress and the drive to eat. *Appetite*, 58(2), 717-721.

- Gröschl, M., Rauh, M., Wagner, R., Neuhuber, W., Metzler, M., Tamgüney, G., ... & Rascher, W. (2001). Identification of leptin in human saliva. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *86*(11), 5234-5239.
- Guinard, J. X., Zoumas-Morse, C., & Walchak, C. (1997). Relation between parotid saliva flow and composition and the perception of gustatory and trigeminal stimuli in foods. *Physiology & behavior*, *63*(1), 109-118.
- Guo, Y., Fu, Z., & Van Eyk, J. E. (2007). A proteomic primer for the clinician. *Proceedings of the American Thoracic Society*, *4*(1), 9-17.
- Haendler, B., Krätzschar, J., Theuring, F., & Schleuning, W. D. (1993). Transcripts for cysteine-rich secretory protein-1 (CRISP-1; DE/AEG) and the novel related CRISP-3 are expressed under androgen control in the mouse salivary gland. *Endocrinology*, *133*(1), 192-198.
- Haggard, P., & de Boer, L. (2014). Oral somatosensory awareness. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *47*, 469-484.
- Hajduk, J., Matysiak, J., & Kokot, Z. J. (2016). Challenges in biomarker discovery with MALDI-TOF MS. *Clinica Chimica Acta*, *458*, 84-98.
- Halaas, J. L., Gajiwala, K. S., Maffei, M., & Cohen, S. L. (1995). Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science*, *269*(5223), 543.
- Hammond, J. B., & Kruger, N. J. (1988). The Bradford method for protein quantitation. *New Protein Techniques*, 25-32.
- Hare-Bruun, H., Nielsen, B. M., Kristensen, P. L., Møller, N. C., Togo, P., & Heitmann, B. L. (2011). Television viewing, food preferences, and food habits among children: a prospective epidemiological study. *BMC Public Health*, *11*(1), 1.
- Hardt, M., Thomas, L. R., Dixon, S. E., Newport, G., Agabian, N., Prakobphol, A., ... & Fisher, S. J. (2005). Toward defining the human parotid gland salivary proteome and peptidome: identification and characterization using 2D SDS-PAGE, ultrafiltration, HPLC, and mass spectrometry. *Biochemistry*, *44*(8), 2885-2899.
- Harris, M., Edgar, M., Meghji, S. (1998). Saliva: its secretion, composition and functions. *Clinical Oral Science*, 179-189.
- Harthoorn, L. F., Schipper, R. G., Loof, A., Vereijken, P. F., Van Heerde, W. L., & Dransfield, E. (2007). Salivary biomarkers associated with perceived satiety and body mass in humans. *PROTEOMICS-Clinical Applications*, *1*(12), 1637-1650.

- Harunaga, J., Hsu, J. C., & Yamada, K. M. (2011). Dynamics of salivary gland morphogenesis. *Journal of dental research*, *90*(9), 1070-1077.
- Hassan, M. I., Waheed, A., Yadav, S., Singh, T. P., & Ahmad, F. (2008). Zinc α 2-glycoprotein: a multidisciplinary protein. *Molecular Cancer Research*, *6*(6), 892-906.
- Hassan, M. I., Waheed, A., Yadav, S., Singh, T. P., & Ahmad, F. (2009). Prolactin inducible protein in cancer, fertility and immunoregulation: structure, function and its clinical implications. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, *66*(3), 447–59. doi:10.1007/s00018-008-8463-x
- Hayes, J. E., & Duffy, V. B. (2007). Revisiting sugar–fat mixtures: sweetness and creaminess vary with phenotypic markers of oral sensation. *Chemical senses*, *32*(3), 225-236.
- Hayes, J. E., & Duffy, V. B. (2008). Oral sensory phenotype identifies level of sugar and fat required for maximal liking. *Physiology & behavior*, *95*(1), 77-87.
- Heft, M. W., & Robinson, M. E. (2010). Age differences in orofacial sensory thresholds. *Journal of dental research*, *89*(10), 1102-1105.
- Henkin, R. I., Schechter, P. J., Hoyer, R., & Mattern, C. F. (1971). Idiopathic hypogeusia with dysgeusia, hyposmia, and dysosmia: a new syndrome. *JAMA*, *217*(4), 434-440.
- Henkin, R. I., Lippoldt, R. E., Bilstad, J., & Edelhoch, H. (1975). A zinc protein isolated from human parotid saliva. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *72*(2), 488–92.
- Henkin, R. I., Martin, B. M., & Agarwal, R. P. (1999). Efficacy of exogenous oral zinc in treatment of patients with carbonic anhydrase VI deficiency. *The American Journal of the Medical Sciences*, *318*(6), 392–405.
- Henskens, Y. M. C., Velden, U., Veerman, E. C. I., & Amerongen, A. V. (1993). Protein, albumin and cystatin concentrations in saliva of healthy subjects and of patients with gingivitis periodonitis. *Journal of periodontal research*, *28*(1), 43-48.
- Henzel, W. J., Watanabe, C., & Stults, J. T. (2003). Protein identification: the origins of peptide mass fingerprinting. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, *14*(9), 931-942.
- Hetherington, M. M., Anderson, A. S., Norton, G. N., & Newson, L. (2006). Situational effects on meal intake: A comparison of eating alone and eating with others. *Physiology & behavior*, *88*(4), 498-505.

- Hiiemae, K. (2004). Mechanisms of food reduction, transport and deglutition: How the texture of food affects feeding behavior. *J. Texture Stud*, 35: 171–200.
- Hillman, J. B., Dorn, L. D., Loucks, T. L., & Berga, S. L. (2012). Obesity and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in adolescent girls. *Metabolism*, 61(3), 341-348.
- Hirtz, C., Chevalier, F., Centeno, D., Rofidal, V., Egea, J. C., Rossignol, M., ... & Deville de Périère, D. (2005). MS characterization of multiple forms of alpha-amylase in human saliva. *Proteomics*, 5(17), 4597-4607.
- Ho, C. S., Lam, C. W., Chan, M. H., Cheung, R. C., Law, L. K., Lit, L. C., ... & Tai, H. L. (2003). Electrospray ionisation mass spectrometry: principles and clinical applications. *Clinical Biochemist Reviews*, 24(1), 3-12.
- Hoehl, K., Schoenberger, G. U., Schwarz, K., & Busch-Stockfisch, M. (2013). Is Perception of Sucrose and Caffeine Affected by Training or Experience? Monitoring Training Effects in Female Subjects over a Half-Year Period. *Journal of Sensory Studies*, 28(1), 1-13.
- Humphrey, S. P., & Williamson, R. T. (2001). A review of saliva: normal composition, flow, and function. *The Journal of prosthetic dentistry*, 85(2), 162-169.
- Idris, A., Khamis, A. G., Ghazali, N. B., Steele, M., Koh, D., & Tuah, N. A. (2016). Salivary leptin concentrations in Bruneian secondary school children. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 6(4), 335-337.
- Igarashi, A., Ito, K., Funayama, S., Hitomi, Y., Ikui, A., Ikeda, M., & Nomura, S. (2008). The salivary protein profiles in the patients with taste disorders: the comparison of salivary protein profiles by two-dimensional gel electrophoresis between the patients with taste disorders and healthy subjects. *Clinica Chimica Acta*, 388(1), 204-206.
- Ikeda, M., Aiba, T., Ikui, A., Inokuchi, A., Kurono, Y., Sakagami, M., ... & Tomita, H. (2005). Taste disorders: a survey of the examination methods and treatments used in Japan. *Acta otolaryngologica*, 125(11), 1203-1210.
- Ishimaru, Y., Inada, H., Kubota, M., Zhuang, H., Tominaga, M., & Matsunami, H. (2006). Transient receptor potential family members PKD1L3 and PKD2L1 form a candidate sour taste receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(33), 12569-12574.
- Iwata, S., Yoshida, R., & Ninomiya, Y. (2014). Taste transductions in taste receptor cells: basic tastes and moreover. *Current pharmaceutical design*, 20(16), 2684-2692.

- Jafarzadeh, A., Sadeghi, M., Karam, G. A., & Vazirinejad, R. (2010). Salivary IgA and IgE levels in healthy subjects: relation to age and gender. *Brazilian oral research*, 24(1), 21-27.
- James, C. E., Laing, D. G., & Oram, N. (1997). A comparison of the ability of 8–9-year-old children and adults to detect taste stimuli. *Physiology & Behavior*, 62(1), 193-197.
- Janfaza, M., Sherman, T. I., Larmore, K. A., Brown-Dawson, J., & Klein, K. O. (2006). Estradiol Levels and Secretory Dynamics in Normal Girls and Boys as Determined by an Ultrasensitive Bioassay: A 10 Year Experience. *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism*, 19(7). doi:10.1515/JPEM.2006.19.7.901
- Janssen, I., Katzmarzyk, P. T., Boyce, W. F., Vereecken, C., Mulvihill, C., Roberts, C., ... & Pickett, W. (2005). Comparison of overweight and obesity prevalence in school-aged youth from 34 countries and their relationships with physical activity and dietary patterns. *Obesity reviews*, 6(2), 123-132.
- Järvelä-Reijonen, E., Karhunen, L., Sairanen, E., Rantala, S., Laitinen, J., Puttonen, S., ... & Föhr, T. (2016). High perceived stress is associated with unfavorable eating behavior in overweight and obese Finns of working age. *Appetite*, 103, 249-258.
- Javed, F., Sundin, U., Altamash, M., Klinge, B., & ENGSTRÖM, P. E. (2009). Self-perceived oral health and salivary proteins in children with type 1 diabetes. *Journal of oral rehabilitation*, 36(1), 39-44.
- Jensen, O. N. (2006). "Interpreting the protein language using proteomics." *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7(6): 391-403.
- Joseph, P. V., Reed, D. R., & Mennella, J. A. (2016). Individual differences among children in sucrose detection thresholds: relationship with age, gender, and bitter taste genotype. *Nursing research*, 65(1), 3.
- Julliard, A. K., Chaput, M. A., Apelbaum, A., Aime, P., Mahfouz, M., & Duchamp-Viret, P. (2007). Changes in rat olfactory detection performance induced by orexin and leptin mimicking fasting and satiation. *Behavioural brain research*, 183(2), 123-129.
- Jyotaki, M., Sanematsu, K., Shigemura, N., Yoshida, R., & Ninomiya, Y. (2016). Leptin suppresses sweet taste responses of enteroendocrine STC-1 cells. *Neuroscience*, 332, 76-87.
- Kalmus, H. (1958). Improvements in the classification of the taster genotypes. *Annals of human genetics*, 22(3), 222-230.

- Katsukawa, H., & Ninomiya, Y. (1999). Capsaicin induces cystatin S-like substances in submandibular saliva of the rat. *Journal of dental research*, 78(10), 1609-1616.
- Kawai, K., Sugimoto, K., Nakashima, K., Miura, H., & Ninomiya, Y. (2000). Leptin as a modulator of sweet taste sensitivities in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(20), 11044-11049.
- Keller, P. J., Kauffman, D. L., Allan, B. J., & Williams, B. L. (1971). Structural differences between the isoenzymes of human parotid α -amylase. *Biochemistry*, 10(26), 4867-4874.
- Keller, K.L., Steinmann, L., Nurse, R.J., Tepper, B.J. (1999). Genetic taste sensitivity to 6-n-propylthiouracil influences food preference in preschool children. *Assoc Chemorecept Sci* (Abstract).
- Keller, K. L., Steinmann, L., Nurse, R. J., & Tepper, B. J. (2002). Genetic taste sensitivity to 6-n-propylthiouracil influences food preference and reported intake in preschool children. *Appetite*, 38(1), 3-12.
- Keller, K. L., & Tepper, B. J. (2004). Inherited Taste Sensitivity to 6-n-Propylthiouracil in Diet and Body Weight in Children. *Obesity research*, 12(6), 904-912.
- Keller, K. L., Reid, A., MacDougall, M. C., Cassano, H., Song, J. L., Deng, L., ... & Kissileff, H. R. (2010). Sex Differences in the Effects of Inherited Bitter Thiourea Sensitivity on Body Weight in 4–6-Year-Old Children. *Obesity*, 18(6), 1194-1200.
- Keast, R. S., & Roper, J. (2007). A complex relationship among chemical concentration, detection threshold, and suprathreshold intensity of bitter compounds. *Chemical senses*, 32(3), 245-253.
- Kim, U. K., Wooding, S., Riaz, N., Jorde, L. B., & Drayna, D. (2006). Variation in the human TAS1R taste receptor genes. *Chemical senses*, 31(7), 599-611.
- Kimura, F., Aizawa, K., Tanabe, K., Shimizu, K., Kon, M., Lee, H., ... & Kono, I. (2008). A rat model of saliva secretory immunoglobulin: a suppression caused by intense exercise. *Scandinavian journal of medicine & science in sports*, 18(3), 367-372.
- Klok, M. D., Jakobsdottir, S., & Drent, M. L. (2007). The role of leptin and ghrelin in the regulation of food intake and body weight in humans: a review. *Obesity reviews*, 8(1), 21-34.
- Knochenmuss, R. (2002). "A quantitative model of ultraviolet matrix-assisted laser desorption/ionization." *J Mass Spectrom*, 37(8): 867-77.

- Knof, K., Lanfer, A., Bildstein, M. O., Buchecker, K., & Hilz, H. (2011). Development of a method to measure sensory perception in children at the European level. *International Journal of Obesity*, 35, S131-S136.
- Krishnan, S., Tryon, R. R., Horn, W. F., Welch, L., & Keim, N. L. (2016). Estradiol, SHBG and leptin interplay with food craving and intake across the menstrual cycle. *Physiology & Behavior*, 165, 304-312.
- Kumanyika, S. K. (2008). Environmental influences on childhood obesity: ethnic and cultural influences in context. *Physiology & behavior*, 94(1), 61-70.
- Kumar, B. (2014). How tasty our tongue is? Recuperado de <http://bhupinderkumar.com>
- Kwon, O., Kim, K. W., & Kim, M. S. (2016). Leptin signalling pathways in hypothalamic neurons. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 73(7), 1457-1477.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *nature*, 227, 680-685.
- Lafarge, J. C., Naour, N., Clément, K., & Guerre-Millo, M. (2010). Cathepsins and cystatin C in atherosclerosis and obesity. *Biochimie*, 92(11), 1580-1586.
- Lamerz, A., Kuepper-Nybelen, J., Wehle, C., Bruning, N., Trost-Brinkhues, G., Brenner, H., ... & Herpertz-Dahlmann, B. (2005). Social class, parental education, and obesity prevalence in a study of six-year-old children in Germany. *International journal of obesity*, 29(4), 373-380.
- Lamey, P. J., & Nolan, A. (1994). The recovery of human saliva using the Salivette system. *European journal of clinical chemistry and clinical biochemistry*, 32(9), 727-728.
- Lamy, E., Graça, G., da Costa, G., Franco, C., e Silva, F. C., Baptista, E. S., & Coelho, A. V. (2010). Changes in mouse whole saliva soluble proteome induced by tannin-enriched diet. *Proteome science*, 8(1), 1.
- Lamy, E., Morzel, M., Rodrigues, L., Pinheiro, C., Costa, A. C., Antunes, C. M., ... & Capela e Silva, F. (2015). The Use of Electrophoresis for the Study of Saliva Involvement in Ingestive Behavior. *Field Effect Electroosmosis - A Novel Phenomenon in Electrokinetics and its Applications in Capillary Electrophoresis*, Chapter 5.
- Lamy, E., Pinheiro, C., Rodrigues, L., Capela-Silva, F., Lopes, O., Tavares, S., & Gaspar, R. (2016). Determinants of tannin-rich food and beverage consumption: oral perception vs. psychosocial aspects.

- Lamy, E., Rawel, H., Schweigert, F. J., Capela e Silva, F., Ferreira, A., Costa, A. R., ... & Sales-Baptista, E. (2011). The effect of tannins on Mediterranean ruminant ingestive behavior: the role of the oral cavity. *Molecules*, 16(4), 2766-2784.
- Lamy, E., Simões, C., Rodrigues, L., Costa, A. R., Vitorino, R., Amado, F., ... & do Carmo, I. (2015). Changes in the salivary protein profile of morbidly obese women either previously subjected to bariatric surgery or not. *Journal of physiology and biochemistry*, 71(4), 691-702.
- Lanfer, A., Bammann, K., Knof, K., Buchecker, K., Russo, P., Veidebaum, T., ... & Lissner, L. (2013). Predictors and correlates of taste preferences in European children: The IDEFICS study. *Food Quality and Preference*, 27(2), 128-136.
- Lanfer, A., Knof, K., Barba, G., Veidebaum, T., Papoutsou, S., De Henauw, S., ... & Lissner, L. (2012). Taste preferences in association with dietary habits and weight status in European children: results from the IDEFICS study. *International Journal of Obesity*, 36(1), 27-34.
- La Sala, M. S., Hurtado, M. D., Brown, A. R., Bohórquez, D. V., Liddle, R. A., Herzog, H., ... & Dotson, C. D. (2013). Modulation of taste responsiveness by the satiation hormone peptide YY. *The FASEB Journal*, 27(12), 5022-5033.
- Lawless, H.T. (1980). A comparison of different methods used to assess sensitivity to the taste of phenylthiocarbamide (PTC). *Chem Senses*, 5:247– 56.
- Lee, C. A., Ismail, B., & Vickers, Z. M. (2012). The role of salivary proteins in the mechanism of astringency. *Journal of food science*, 77(4), C381-C387.
- Lesschaeve, I., & Noble, A. C. (2005). Polyphenols: factors influencing their sensory properties and their effects on food and beverage preferences. *The American journal of clinical nutrition*, 81(1), 330S-335S.
- Leinonen, J., Parkkila, S., Kaunisto, K., Koivunen, P., & Rajaniemi, H. (2001). Secretion of carbonic anhydrase isoenzyme VI (CA VI) from human and rat lingual serous von Ebner's glands. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 49(5), 657-662.
- Lesschaeve, I., & Noble, A. C. (2005). Polyphenols: factors influencing their sensory properties and their effects on food and beverage preferences. *The American journal of clinical nutrition*, 81(1), 330S-335S.
- Liao, J., & Schultz, P. G. (2003). Three sweet receptor genes are clustered in human chromosome 1. *Mammalian genome*, 14(5), 291-301.

- Lima, D. P., Diniz, D. G., Moimaz, S. A. S., Sumida, D. H., & Okamoto, A. C. (2010). Saliva: reflection of the body. *International Journal of Infectious Diseases*, *14*(3), e184-e188.
- Linforth, R., Martin, F., Carey, M., Davidson, J., & Taylor, A. J. (2002). Retronasal transport of aroma compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*(5), 1111-1117.
- Lipchock, S. V., Mennella, J. A., Spielman, A. I., & Reed, D. R. (2013). Human bitter perception correlates with bitter receptor messenger RNA expression in taste cells. *The American journal of clinical nutrition*, *98*(4), 1136-1143.
- Lissner, L., Lanfer, A., Gwozdz, W., Olafsdottir, S., Eiben, G., Moreno, L. A., ... & Kourides, Y. (2012). Television habits in relation to overweight, diet and taste preferences in European children: the IDEFICS study. *European journal of epidemiology*, *27*(9), 705-715.
- Livnat, G., Bentur, L., Kuzmishsky, E., & Nagler, R. M. (2010). Salivary profile and oxidative stress in children and adolescents with cystic fibrosis. *Journal of oral pathology & medicine*, *39*(1), 16-21.
- Lloyd, D. K. (2008). Capillary electrophoresis analysis of biofluids with a focus on less commonly analyzed matrices. *Journal of Chromatography B*, *866*(1), 154-166.
- Lohman, T.G., Roche, A.F., Martorell, R. (1988). Anthropometric Standardization Reference Manual. Illinois: Human Kinetics Books.
- Loman, S., Jansen, H. M., Out, T. A., & Lutter, R. (1999). Interleukin-4 and interferon-synergistically increase secretory component gene expression, but are additive in stimulating secretory immunoglobulin A release by Calu-3 airway epithelial cells. *Immunology*, *96*(4), 537-543.
- Looy, H., & Weingarten, H. P. (1992). Facial expressions and genetic sensitivity to 6-n-propylthiouracil predict hedonic response to sweet. *Physiology & Behavior*, *52*(1), 75-82.
- Lorenz, K., Bader, M., Klaus, A., Weiss, W., Görg, A., & Hofmann, T. (2011). Orosensory stimulation effects on human saliva proteome. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *59*(18), 10219–31. doi:10.1021/jf2024352
- Lu, B., Breza, J. M., Nikonov, A. A., Paedae, A. B., & Contreras, R. J. (2012). Leptin increases temperature-dependent chorda tympani nerve responses to sucrose in mice. *Physiology & behavior*, *107*(4), 533-539.
- Lu, Y., & Bennick, A. (1998). Interaction of tannin with human salivary proline-rich proteins. *Archives of oral biology*, *43*(9), 717-728.

- Luc, G., Bard, J. M., Lesueur, C., Arveiler, D., Evans, A., Amouyel, P., ... & PRIME Study Group. (2006). Plasma cystatin-C and development of coronary heart disease: The PRIME Study. *Atherosclerosis*, *185*(2), 375-380.
- Matt, P., Fu, Z., Fu, Q., & Van Eyk, J. E. (2008). Biomarker discovery: proteome fractionation and separation in biological samples. *Physiological genomics*, *33*(1), 12-17.
- McLaren, L. (2007). Socioeconomic status and obesity. *Epidemiologic reviews*, *29*(1), 29-48.
- Macpherson, L. J., Hwang, S. W., Miyamoto, T., Dubin, A. E., Patapoutian, A., & Story, G. M. (2006). More than cool: promiscuous relationships of menthol and other sensory compounds. *Molecular and Cellular Neuroscience*, *32*(4), 335-343.
- McColl, J., Horvath, R., Aref, A., Larcombe, L., Chianella, I., Morgan, S., ... & Ramsden, J. J. (2009). Polyphenol control of cell spreading on glycoprotein substrata. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, *20*(5-6), 841-851.
- Maffei, M., Halaas, J., Ravussin, E., Pratley, R. E., Lee, G. H., Zhang, Y., ... & Kern, P. A. (1995). Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nature medicine*, *1*(11), 1155-1161.
- Mandel, A. L., des Gachons, C. P., Plank, K. L., Alarcon, S., & Breslin, P. A. (2010). Individual differences in AMY1 gene copy number, salivary α -amylase levels, and the perception of oral starch. *PloS one*, *5*(10), e13352.
- Martínez-Ruiz, N. D. R., Wall-Medrano, A., Jiménez-Castro, J. A., López-Díaz, J. A., & Angulo-Guerrero, O. (2014). Relación entre el fenotipo PROP, el índice de masa corporal, la circunferencia de cintura, la grasa corporal total y el consumo dietario. *Nutrición Hospitalaria*, *29*(1), 173-179.
- Margolskee, R. F. (2002). Molecular mechanisms of bitter and sweet taste transduction. *Journal of Biological Chemistry*, *277*(1), 1-4.
- Marquezin, M. C. S., Pedroni-Pereira, A., Araujo, D. S., Rosar, J. V., Barbosa, T. S., & Castelo, P. M. (2016). Descriptive analysis of the masticatory and salivary functions and gustatory sensitivity in healthy children. *Acta Odontologica Scandinavica*, 1-6.
- Martínez-Ruiz, N. R., López-Díaz, J. A., Wall-Medrano, A., Jiménez-Castro, J. A., & Angulo, O. (2014). Oral fat perception is related with body mass index, preference and consumption of high-fat foods. *Physiology & behavior*, *129*, 36-42.

- Matsuo, R. (2000). Role of saliva in the maintenance of taste sensitivity. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 11(2), 216-229.
- Mela, D. J. (1990). Gustatory perception of isohumulones: influence of sex and thiourea taster status. *Chemical senses*, 15(4), 485-490.
- Marshall, S. J., Biddle, S. J., Gorely, T., Cameron, N., & Murdey, I. (2004). Relationships between media use, body fatness and physical activity in children and youth: a meta-analysis. *International journal of obesity*, 28(10), 1238-1246.
- Melis, M., Aragoni, M. C., Arca, M., Cabras, T., Caltagirone, C., Castagnola, M., ... & Barbarossa, I. T. (2013). Marked increase in PROP taste responsiveness following oral supplementation with selected salivary proteins or their related free amino acids. *PloS one*, 8(3), e59810.
- Mennella, J. A., Finkbeiner, S., & Reed, D. R. (2012). The proof is in the pudding: Children prefer lower fat but higher sugar than do mothers. *International Journal of Obesity*, 36, 1285–1291.
- Mennella, J. A., Finkbeiner, S., Lipchock, S. V., Hwang, L. D., & Reed, D. R. (2014). Preferences for salty and sweet tastes are elevated and related to each other during childhood. *PLOS ONE*, 9, e92201.
- Mennella, J. A., Pepino, M. Y., & Reed, D. R. (2005). Genetic and environmental determinants of bitter perception and sweet preferences. *Pediatrics*, 115(2), e216-e222.
- Mennella, J. A., Reed, D. R., Mathew, P. S., Roberts, K. M., & Mansfield, C. J. (2015). "A spoonful of sugar helps the medicine go down": bitter masking by sucrose among children and adults. *Chemical senses*, 40(1), 17-25.
- Mennella, J. A., Bobowski, N. K., & Reed, D. R. (2016). The development of sweet taste: from biology to hedonics. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, 1-8.
- Meredith, T. L., Corcoran, A., & Roper, S. D. (2015). Leptin's effect on taste bud calcium responses and transmitter secretion. *Chemical senses*, 40(4), 217-222.
- Mese, H., & Matsuo, R. (2007). Salivary secretion, taste and hyposalivation. *Journal of oral rehabilitation*, 34(10), 711-723.
- Meyerhof, W., Batram, C., Kuhn, C., Brockhoff, A., Chudoba, E., Bufe, B., Appendino, G., Behrens, M. (2010). The molecular receptive ranges of human TAS2R bitter taste receptors. *Chem.Senses*. 35, 157–170.

- Michels, N., Sioen, I., Braet, C., Huybrechts, I., Vanaelst, B., Wolters, M., & De Henauw, S. (2013). Relation between salivary cortisol as stress biomarker and dietary pattern in children. *Psychoneuroendocrinology*, *38*(9), 1512-1520.
- Miller, C. S., Foley, J. D., Bailey, A. L., Campell, C. L., Humphries, R. L., Christodoulides, N., ... & Redding, S. W. (2010). Current developments in salivary diagnostics. *Biomarkers in medicine*, *4*(1), 171-189.
- Mojet, J., Christ-Hazelhof, E., Heidema, J. (2001). Taste perception with age: generic or specific losses in threshold sensitivity to the five basic tastes? *Chem.Senses*, *26*:845-860.
- Mounayar, R., Morzel, M., Brignot, H., Tremblay-Franco, M., Canlet, C., Lucchi, G., ... & Neyraud, E. (2014). Salivary markers of taste sensitivity to oleic acid: a combined proteomics and metabolomics approach. *Metabolomics*, *10*(4), 688-696.
- Monneuse, M. O., Rigal, N., Frelut, M. L., Hladik, C. M., Simmen, B., & Pasquet, P. (2008). Taste acuity of obese adolescents and changes in food neophobia and food preferences during a weight reduction session. *Appetite*, *50*(2), 302-307.
- Morzel, M., Chabanet, C., Schwartz, C., Lucchi, G., Ducoroy, P., & Nicklaus, S. (2014). Salivary protein profiles are linked to bitter taste acceptance in infants. *European Journal of Pediatrics*, *173*(5), 575–82. doi:10.1007/s00431-013-2216-z
- Morzel, M., Neyraud, E., Brignot, H., Ducoroy, P., Jeannin, A., Lucchi, G., ... & Gaillard, S. (2015). Multi-omics profiling reveals that eating difficulties developed consecutively to artificial nutrition in the neonatal period are associated to specific saliva composition. *Journal of proteomics*, *128*, 105-112.
- Morzel, M., Palicki, O., Chabanet, C., Lucchi, G., Ducoroy, P., Chambon, C., & Nicklaus, S. (2011). Saliva electrophoretic protein profiles in infants: changes with age and impact of teeth eruption and diet transition. *Archives of oral biology*, *56*(7), 634-642.
- Morris-Wiman, J., Sego, R., Brinkley, L., & Dolce, C. (2000). The effects of sialoadenectomy and exogenous EGF on taste bud morphology and maintenance. *Chemical senses*, *25*(1), 9-19.
- Mounayar, R., Morzel, M., Brignot, H., Tremblay-Franco, M., Canlet, C., Lucchi, G., Ducoroy, P., Feron, G. & Neyraud, E. (2014). Salivary markers of taste sensitivity to oleic acid: a combined proteomics and metabolomics approach. *Metabolomics*, *10*, 688-696.
- Nagai, A., Kubota, M., Sakai, M., & Higashiyama, Y. (2014). Normal taste acuity and preference in female adolescents with impaired 6-n-propylthiouracil sensitivity. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, *23*(3), 423–8.

- Naim, M., Nir, S., Spielman, A., Noble, A. C., Peri, I., Rodin, S., & Samuelov-Zubare, M. (2002). Hypothesis of receptor-dependent and receptor-independent mechanisms for bitter and sweet taste transduction. In *ACS Symposium Series*, 825,2-17.
- Nakamura, Y., Sanematsu, K., Ohta, R., Shirotsaki, S., Koyano, K., Nonaka, K., ... & Ninomiya, Y. (2008). Diurnal variation of human sweet taste recognition thresholds is correlated with plasma leptin levels. *Diabetes*, 57(10), 2661-2665.
- Nakagawa, M., Mizuma, K., & Inui, T. (1996). Changes in taste perception following mental or physical stress. *Chemical senses*, 21(2), 195-200.
- Närhi, T. O., Tenovuuo, J., Ainamo, A., & Vilja, P. (1994). Antimicrobial factors, sialic acid, and protein concentration in whole saliva of the elderly. *European Journal of Oral Sciences*, 102(2), 120-125.
- Nater, U. M., Rohleder, N., Gaab, J., Berger, S., Jud, A., Kirschbaum, C., & Ehlert, U. (2005). Human salivary alpha-amylase reactivity in a psychosocial stress paradigm. *International Journal of Psychophysiology*, 55(3), 333-342.
- Nater, U. M., La Marca, R., Florin, L., Moses, A., Langhans, W., Koller, M. M., & Ehlert, U. (2006). Stress-induced changes in human salivary alpha-amylase activity—associations with adrenergic activity. *Psychoneuroendocrinology*, 31(1), 49-58.
- Nater, U. M., & Rohleder, N. (2009). Salivary alpha-amylase as a non-invasive biomarker for the sympathetic nervous system: current state of research. *Psychoneuroendocrinology*, 34(4), 486-496.
- Navabi, N., & Hamzeh, F. (2008). Investigation of the relationship between sweet taste sensitivity and body mass index.
- Nayak, A., & Carpenter, G. H. (2008). A physiological model of tea-induced astringency. *Physiology & behavior*, 95(3), 290-294.
- Neumark-Sztainer, D., Story, M., Perry, C., & Casey, M. A. (1999). Factors influencing food choices of adolescents: findings from focus-group discussions with adolescents. *Journal of the American dietetic association*, 99(8), 929-937.
- Neyraud, E., Sayd, T., Morzel, M., & Dransfield, E. (2006). Proteomic analysis of human whole and parotid salivas following stimulation by different tastes. *Journal of proteome research*, 5(9), 2474-2480.

- Niki, M., Jyotaki, M., Yoshida, R., Yasumatsu, K., Shigemura, N., DiPatrizio, N. V., ... & Ninomiya, Y. (2015). Modulation of sweet taste sensitivities by endogenous leptin and endocannabinoids in mice. *The Journal of physiology*, 593(11), 2527-2545.
- Nordin, S., Razani, L. J., Markison, S., & Murphy, C. (2003). Age-associated increases in intensity discrimination for taste. *Experimental aging research*, 29(3), 371-381.
- O'Brien, S. A., Feeney, E. L., Scannell, A. G., Markey, A., & Gibney, E. R. (2013). Bitter taste perception and dietary intake patterns in Irish children. *Journal of nutrigenetics and nutrigenomics*, 6(1), 43-58.
- O'Farrell, P. H. (1975). High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *Journal of biological chemistry*, 250(10), 4007-4021.
- Padiglia, A., Zonza, A., Atzori, E., Chillotti, C., Calò, C., Tepper, B. J., & Barbarossa, I. T. (2010). Sensitivity to 6-n-propylthiouracil is associated with gustin (carbonic anhydrase VI) gene polymorphism, salivary zinc, and body mass index in humans. *The American journal of clinical nutrition*, 92(3), 539-545.
- Palamim, M. R. (1999). Funções da saliva para a cavidade oral: aspectos relacionados à mastigação, à deglutição e à fala. *Fonoatual*, 3:19-26.
- Pallaro, A., Barbeito, S., Taberner, P., Marino, P., Franchello, A., Strasnoy, I., ... & Slobodianik, N. (2002). Total salivary IgA, serum C3c and IgA in obese school children. *The Journal of nutritional biochemistry*, 13(9), 539-542.
- Pasquet, P., Laure Frelut, M., Simmen, B., Marcel Hladik, C., & Monneuse, M. O. (2007). Taste perception in massively obese and in non-obese adolescents. *International Journal of Pediatric Obesity*, 2(4), 242-248.
- Patrikainen, M., Pan, P., Kuleshkaya, N., Voikar, V., & Parkkila, S. (2014). The role of carbonic anhydrase VI in bitter taste perception: evidence from the Car6^{-/-} mouse model. *Journal of Biomedical Science*, 21, 82. doi:10.1186/s12929-014-0082-2
- Pedersen, A.M., Bardow, A., Jensen, S.B., and Nauntofte, B. (2002). Saliva and gastrointestinal functions of taste, mastication, swallowing, and digestion. *Oral Dis*, 8: 117–129.
- Perry, G. H., Dominy, N. J., Claw, K. G., Lee, A. S., Fiegler, H., Redon, R., ... & Carter, N. P. (2007). Diet and the evolution of human amylase gene copy number variation. *Nature genetics*, 39(10), 1256-1260.

- Petersen, J. R., Okorodudu, A. O., Mohammad, A., & Payne, D. A. (2003). Capillary electrophoresis and its application in the clinical laboratory. *Clinica Chimica Acta*, 330(1), 1-30.
- Popkin, B. M., & Gordon-Larsen, P. (2004). The nutrition transition: worldwide obesity dynamics and their determinants. *International journal of obesity*, 28, S2-S9.
- Prud'Homme, M. J., Lacroix, M. C., Badonnel, K., Gougis, S., Baly, C., Salesse, R., & Caillol, M. (2009). Nutritional status modulates behavioural and olfactory bulb Fos responses to isoamyl acetate or food odour in rats: roles of orexins and leptin. *Neuroscience*, 162(4), 1287-1298.
- Prutkin, J., Duffy, V. B., Etter, L., Fast, K., Gardner, E., Lucchina, L. A., ... & Bartoshuk, L. M. (2000). Genetic variation and inferences about perceived taste intensity in mice and men. *Physiology & behavior*, 69(1), 161-173.
- Quintana, M., Palicki, O., Lucchi, G., Ducoroy, P., Chambon, C., Salles, C., & Morzel, M. (2009). Short-term modification of human salivary proteome induced by two bitter tastants, urea and quinine. *Chemosensory Perception*, 2(3), 133-142.
- Rabilloud, T., Chevallet, M., Luche, S., & Lelong, C. (2010). Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: past, present and future. *Journal of proteomics*, 73(11), 2064-2077.
- Rai, B., & Kaur, J. (2012). Mental and physical workload, salivary stress biomarkers and taste perception: Mars desert research station expedition. *North American journal of medical sciences*, 4(11), 577.
- Randeva, H. S., Karteris, E., Lewandowski, K. C., Sailesh, S., O'Hare, P., & Hillhouse, E. W. (2003a). Circadian rhythmicity of salivary leptin in healthy subjects. *Molecular genetics and metabolism*, 78(3), 229-235.
- Randeva, H. S., Karteris, E., Lewandowski, K. C., Sailesh, S., O'Hare, P., & Hillhouse, E. W. (2003b). Circadian rhythmicity of salivary leptin in healthy subjects. *Molecular genetics and metabolism*, 78(3), 229-235.
- Rao, M., Afshin, A., Singh, G., & Mozaffarian, D. (2013). Do healthier foods and diet patterns cost more than less healthy options? A systematic review and meta-analysis. *BMJ open*, 3(12), e004277.
- Reed, D. R., & Margolskee, R. F. (2010). Gustation genetics: sweet gustducin! *Chemical senses*, 35(7), 549-550.

- Reed, D. R., Zhu, G., Breslin, P. A., Duke, F. F., Henders, A. K., Campbell, M. J., ... & Wright, M. J. (2010). The perception of quinine taste intensity is associated with common genetic variants in a bitter receptor cluster on chromosome 12. *Human molecular genetics*, *19*(12), ddq324.
- Reiche, E. M. V., Nunes, S. O. V., & Morimoto, H. K. (2004). Stress, depression, the immune system, and cancer. *The lancet oncology*, *5*(10), 617-625.
- Reinehr, T., Kulle, A., Wolters, B., Lass, N., Welzel, M., Riepe, F., & Holterhus, P. M. (2013). Steroid hormone profiles in prepubertal obese children before and after weight loss. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *98*(6), E1022-E1030.
- Risso, D. S., Mezzavilla, M., Pagani, L., Robino, A., Morini, G., Tofanelli, S., ... & Gasparini, P. (2016). Global diversity in the TAS2R38 bitter taste receptor: revisiting a classic evolutionary PROPosal. *Scientific reports*, *6*.
- Robinson, T. N. (1999). Reducing children's television viewing to prevent obesity: a randomized controlled trial. *Jama*, *282*(16), 1561-1567.
- Rodriguez-Suarez, E., Mato, J. M., & Elortza, F. (2012). Proteomics analysis of human nonalcoholic fatty liver. *Liver Proteomics: Methods and Protocols*, 241-258.
- Rodrigues, L., Mouta, R., Costa, A. R., Pereira, A., e Silva, F. C., Amado, F., ... & Lamy, E. (2015). Effects of high-fat diet on salivary α -amylase, serum parameters and food consumption in rats. *Archives of oral biology*, *60*(6), 854-862.
- Rohleder, N., & Nater, U. M. (2009). Determinants of salivary α -amylase in humans and methodological considerations. *Psychoneuroendocrinology*, *34*(4), 469-485.
- Roper, S. D. (2007). Signal transduction and information processing in mammalian taste buds. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*, *454*(5), 759-776.
- Rossetti, D., Yakubov, G. E., Stokes, J. R., Williamson, A. M., & Fuller, G. G. (2008). Interaction of human whole saliva and astringent dietary compounds investigated by interfacial shear rheology. *Food Hydrocolloids*, *22*(6), 1068-1078.
- Roura, E., Aldayyani, A., Thavaraj, P., Prakash, S., Greenway, D., Thomas, W. G., ... & Foster, S. R. (2015). Variability in human bitter taste sensitivity to chemically diverse compounds can be accounted for by differential TAS2R activation. *Chemical senses*, bfv024.
- Sáinz, N., Barrenetxe, J., Moreno-Aliaga, M. J., & Martínez, J. A. (2015). Leptin resistance and diet-induced obesity: central and peripheral actions of leptin. *Metabolism*, *64*(1), 35-46.

- Salbe, A.D., DelParigi, A., Pratley, R.E., Drewnowski, A., Tataranni, P.A. (2004). Taste preferences and body weight changes in an obesity-prone population. *Am J Clin Nutr*, 79:372–8.
- Salles, C., Chagnon, M. C., Feron, G., Guichard, E., Laboure, H., Morzel, M., ... & Yven, C. (2010). In-mouth mechanisms leading to flavor release and perception. *Critical reviews in food science and nutrition*, 51(1), 67-90.
- Sandell, M., Hoppu, U., Mikkilä, V., Mononen, N., Kähönen, M., Männistö, S., ... & Raitakari, O. T. (2014). Genetic variation in the hTAS2R38 taste receptor and food consumption among Finnish adults. *Genes & nutrition*, 9(6), 1.
- Sanematsu, K., Horio, N., Murata, Y., Yoshida, R., Ohkuri, T., Shigemura, N., & Ninomiya, Y. (2009). Modulation and transmission of sweet taste information for energy homeostasis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1170(1), 102-106.
- Santos, J. L., Saus, E., Smalley, S. V., Cataldo, L. R., Alberti, G., Parada, J., ... & Estivill, X. (2012). Copy number polymorphism of the salivary amylase gene: implications in human nutrition research. *Journal of nutrigenetics and nutrigenomics*, 5(3), 117-131.
- Sartor, F., Donaldson, L. F., Markland, D. A., Loveday, H., Jackson, M. J., & Kubis, H. P. (2011). Taste perception and implicit attitude toward sweet related to body mass index and soft drink supplementation. *Appetite*, 57(1), 237-246.
- Savigner, A., Duchamp-Viret, P., Grosmaître, X., Chaput, M., Garcia, S., Ma, M., & Palouzier-Paulignan, B. (2009). Modulation of spontaneous and odorant-evoked activity of rat olfactory sensory neurons by two anorectic peptides, insulin and leptin. *Journal of neurophysiology*, 101(6), 2898-2906.
- Scarano, E., Fiorita, A., Picciotti, P. M., Passali, G. C., Calo, L., Cabras, T., ... & Paludetti, G. A. E. T. A. N. O. (2010). Proteomics of saliva: personal experience. *Acta Otorhinolaryngologica Italica*, 30(3), 125.
- Scaglioni, S., Salvioni, M., & Galimberti, C. (2008). Influence of parental attitudes in the development of children eating behaviour. *British Journal of Nutrition*, 99(S1), S22-S25.
- Shigemura, N., Ohta, R., Kusakabe, Y., Miura, H., Hino, A., Koyano, K., ... & Ninomiya, Y. (2004). Leptin modulates behavioral responses to sweet substances by influencing peripheral taste structures. *Endocrinology*, 145(2), 839-847.
- Schiffman, S. S. (1993). Perception of taste and smell in elderly persons. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 33(1), 17-26.

- Schipper, R. G., Silletti, E., & Vingerhoeds, M. H. (2007). Saliva as research material: biochemical, physicochemical and practical aspects. *Archives of oral biology*, 52(12), 1114-1135.
- Schmale, H., Holtgreve-Grez, H., & Christiansen, H. (1990). Possible role for salivary gland protein in taste reception indicated by homology to lipophilic-ligand carrier proteins.
- Shrewsbury, V., & Wardle, J. (2008). Socioeconomic status and adiposity in childhood: a systematic review of cross-sectional studies 1990–2005. *Obesity*, 16(2), 275-284.
- Schwarz, B., & Hofmann, T. (2008). Is there a direct relationship between oral astringency and human salivary protein binding? *European Food Research and Technology*, 227(6), 1693-1698.
- Schwartz, C., Issanchou, S., & Nicklaus, S. (2009). Developmental changes in the acceptance of the five basic tastes in the first year of life. *British Journal of Nutrition*, 102(09), 1375-1385.
- Shah, M., Doshi, Y., & Hirani, S. H. (2010). Concentration of salivary immunoglobulin A, in relation to periodontal disease, plaque, and calculus. *Journal of the International Clinical Dental Research Organization*, 2(3), 126.
- Shatzman, A. R., & Henkin, R. I. (1981). Gustin concentration changes relative to salivary zinc and taste in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 78(6), 3867-3871.
- Shevchenko, A., Tomas, H., Havli, J., Olsen, J. V., & Mann, M. (2006). In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nature protocols*, 1(6), 2856-2860.
- Simchen, U., Koebnick, C., Hoyer, S., Issanchou, S., & Zunft, H. J. (2006). Odour and taste sensitivity is associated with body weight and extent of misreporting of body weight. *European Journal of Clinical Nutrition*, 60(6), 698-705.
- Sivakumar, T., Hand, A. R., & Mednieks, M. (2009). Secretory proteins in the saliva of children. *Journal of oral science*, 51(4), 573-580.
- Smith, D., Margolskee, R. (2006). Making Sense of Taste. *Scientific American* sp 16, 84 - 92 doi:10.1038/scientificamerican0906-84sp
- Smutzer, G., Desai, H., Coldwell, S. E., & Griffith, J. W. (2013). Validation of edible taste strips for assessing PROP taste perception. *Chemical senses*, 38(6), 529-539.

- Starzak, D. E., Konkol, K. F., & McKune, A. J. (2016). Effects of Cardiorespiratory Fitness and Obesity on Salivary Secretory IgA and Alpha-Amylase in South African Children. *Children*, 3(3), 12.
- Stevens, J. C., Cain, W. S., Demarque, A., & Ruthruff, A. M. (1991). On the discrimination of missing ingredients: aging and salt flavor. *Appetite*, 16(2), 129-140.
- Soares, S., Brandão, E., Mateus, N., & De Freitas, V. (2015). Sensorial properties of red wine polyphenols: astringency and bitterness. *Critical reviews in food science and nutrition*, (just-accepted), 00-00.
- Spengler, B. & R. J. Cotter (1990). "Ultraviolet laser desorption/ionization mass spectrometry of proteins above 100,000 daltons by pulsed ion extraction time-of-flight analysis." *Anal Chem*, 62(8): 793-6.
- Spielman, A. I., D'abundo, S., Field, R. B., & Schmale, H. (1993). Protein analysis of human von Ebner saliva and a method for its collection from the foliate papillae. *Journal of dental research*, 72(9), 1331-1335.
- Spudeit, D. A., Dolzan, M. D., & Micke, G. A. (2012). Conceitos básicos em Eletroforese Capilar. *Scientia Chromatographica*, 4(4), 287-329.
- Swithers, S. E., Martin, A. A., & Davidson, T. L. (2010). High-intensity sweeteners and energy balance. *Physiology & behavior*, 100(1), 55-62.
- Takai, N., Yamaguchi, M., Aragaki, T., Eto, K., Uchihashi, K., & Nishikawa, Y. (2007). Gender-Specific Differences in Salivary Biomarker Responses to Acute Psychological Stress. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1098(1), 510-515.
- Tanaka, K., Tsugawa, N., Kim, Y. O., Sanuki, N., Takeda, U., & Lee, L. J. (2009). A new rapid and comprehensive peptidome analysis by one-step direct transfer technology for 1-D electrophoresis/MALDI mass spectrometry. *Biochemical and biophysical research communications*, 379(1), 110-114.
- Thanakun, S., Watanabe, H., Thaweboon, S., & Izumi, Y. (2014). Comparison of salivary and plasma adiponectin and leptin in patients with metabolic syndrome. *Diabetology & metabolic syndrome*, 6(1), 1.
- Tataranni, P. A., Larson, D. E., Snitker, S., Young, J. B., Flatt, J. P., & Ravussin, E. (1996). Effects of glucocorticoids on energy metabolism and food intake in humans. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 271(2), E317-E325.

- Temporini, C., Calleri, E., Massolini, G., & Caccialanza, G. (2008). Integrated analytical strategies for the study of phosphorylation and glycosylation in proteins. *Mass spectrometry reviews*, 27(3), 207-236.
- Thanos, P. K., Robison, L. S., Robinson, J. K., Michaelides, M., Wang, G. J., & Volkow, N. D. (2013). Obese rats with deficient leptin signaling exhibit heightened sensitivity to olfactory food cues. *Synapse*, 67(4), 171-178.
- Thompson, R. C., & Ohlsson, K. (1986). Isolation, properties, and complete amino acid sequence of human secretory leukocyte protease inhibitor, a potent inhibitor of leukocyte elastase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83(18), 6692-6696.
- Tepper, B. J., & Nurse, R. J. (1997). Fat perception is related to PROP taster status. *Physiology & behavior*, 61(6), 949-954.
- Tepper, B. J., & Seldner, A. C. (1999). Sweet taste and intake of sweet foods in normal pregnancy and pregnancy complicated by gestational diabetes mellitus. *The American journal of clinical nutrition*, 70(2), 277-284.
- Tepper, B. J., Christensen, C. M., & Cao, J. (2001). Development of brief methods to classify individuals by PROP taster status. *Physiology & Behavior*, 73(4), 571-7.
- Tepper, B. J., & Ullrich, N. V. (2002). Influence of genetic taste sensitivity to 6-n-propylthiouracil (PROP), dietary restraint and disinhibition on body mass index in middle-aged women. *Physiology & behavior*, 75(3), 305-312.
- Tepper, B. J. (2008). Nutritional implications of genetic taste variation: the role of PROP sensitivity and other taste phenotypes. *Annu. Rev. Nutr.*, 28, 367-388.
- Tepper, B. J., Koelliker, Y., Zhao, L., Ullrich, N. V., Lanzara, C., D'Adamo, P., ... & Gasparini, P. (2008). Variation in the Bitter-taste Receptor Gene TAS2R38, and Adiposity in a Genetically Isolated Population in Southern Italy. *Obesity*, 16(10), 2289-2295.
- Tepper, B. J., Banni, S., Melis, M., Crnjar, R., & Tomassini Barbarossa, I. (2014). Genetic sensitivity to the bitter taste of 6-n-propylthiouracil (PROP) and its association with physiological mechanisms controlling body mass index (BMI). *Nutrients*, 6(9), 3363-3381.
- Tepper, B. J., White, E. A., Koelliker, Y., Lanzara, C., d'Adamo, P., & Gasparini, P. (2009). Genetic variation in taste sensitivity to 6-n-propylthiouracil and its relationship to taste perception and food selection. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1170(1), 126-139.

- Therrien, F., Drapeau, V., Lalonde, J., Lupien, S. J., Beaulieu, S., Tremblay, A., & Richard, D. (2007). Awakening cortisol response in lean, obese, and reduced obese individuals: effect of gender and fat distribution. *Obesity*, *15*(2), 377-385.
- Trellakis, S., Tagay, S., Fischer, C., Rydleuskaya, A., Scherag, A., Bruderek, K., ... & Brandau, S. (2011). Ghrelin, leptin and adiponectin as possible predictors of the hedonic value of odors. *Regulatory peptides*, *167*(1), 112-117.
- Torres, S. J., & Nowson, C. A. (2007). Relationship between stress, eating behavior, and obesity. *Nutrition*, *23*(11), 887-894.
- Towbin, H., Staehelin, T., & Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *76*(9), 4350-4354.
- Tsigos, C., & Chrousos, G. P. (2002). Hypothalamic–pituitary–adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *Journal of psychosomatic research*, *53*(4), 865-871.
- Turnbull, B., & Matisoo-Smith, E. (2002). Taste sensitivity to 6-n-propylthiouracil predicts acceptance of bitter-tasting spinach in 3–6-y-old children. *The American journal of clinical nutrition*, *76*(5), 1101-1105.
- Uhart, M., Chong, R. Y., Oswald, L., Lin, P. I., & Wand, G. S. (2006). Gender differences in hypothalamic–pituitary–adrenal (HPA) axis reactivity. *Psychoneuroendocrinology*, *31*(5), 642-652.
- Umabiki, M., Tsuzaki, K., Kotani, K., Nagai, N., Sano, Y., Matsuoka, Y., ... & Higashi, A. (2010). The improvement of sweet taste sensitivity with decrease in serum leptin levels during weight loss in obese females. *The Tohoku journal of experimental medicine*, *220*(4), 267-271.
- Ünlü, M., Morgan, M. E., & Minden, J. S. (1997). Difference gel electrophoresis. A single gel method for detecting changes in protein extracts. *Electrophoresis*, *18*(11), 2071-2077.
- Veerman, E. C. I., Keybus, P. V. D., Vissink, A., & Amerongen, A. V. (1996). Human glandular salivas: their separate collection and analysis. *European journal of oral sciences*, *104*(4), 346-352.
- Veaser, S., M. J. Dunn, et al. (2001). "Multiresolution image registration for two-dimensional gel electrophoresis." *Proteomics*, *1*(7): 856-70.

- Viana, V., Santos, P. L. D., & Guimarães, M. J. (2008). Comportamento e hábitos alimentares em crianças e jovens: uma revisão da literatura. *Psicologia, saúde & doenças*, 9(2), 209-231.
- Vingerhoeds, M.H., Blijdenstein, T.B.J., Zoet, F.D., and van Aken, G.A. (2005). Emulsion flocculation induced by saliva and mucin. *Food Hydrocolloid*, 19:915–922.
- Vitorino, R., Lobo, M. J. C., Ferrer-Correira, A. J., Dubin, J. R., Tomer, K. B., Domingues, P. M., & Amado, F. M. (2004). Identification of human whole saliva protein components using proteomics. *Proteomics*, 4(4), 1109-1115.
- Vors, C., Drai, J., Gabert, L., Pineau, G., Laville, M., Vidal, H., ... & Feron, G. (2015). Salivary composition in obese vs normal-weight subjects: towards a role in postprandial lipid metabolism. *International journal of obesity*, 39(9), 1425-1428.
- Wada, O. H., Yamamori, T., Shimazaki, N., Ishibashi, K. & Seino K. (2010). Function of salivary histatin 5 for bitter substances. *88th General Session and Exhibition of the IADR*(International Association for Dental Research), p. MM–598.
- Wang, R., van Keeken, N. M., Siddiqui, S., Dijksman, L. M., Maudsley, S., Derval, D., ... & Martin, B. (2014). Higher TNF- α , IGF-1, and leptin levels are found in tasters than non-tasters. *Frontiers in endocrinology*, 5.
- Wang, Y. (2002). Is obesity associated with early sexual maturation? A comparison of the association in American boys versus girls. *Pediatrics*, 110(5), 903-910.
- Ward, A., Fall, C. H., Stein, C. E., Kumaran, K., Veena, S. R., Wood, P. J., ... & Phillips, D. I. (2003). Cortisol and the metabolic syndrome in South Asians. *Clinical endocrinology*, 58(4), 500-505.
- Wardle, J., Guthrie, C., Sanderson, S., Birch, L., & Plomin, R. (2001). Food and activity preferences in children of lean and obese parents. *International Journal of Obesity & Related Metabolic Disorders*, 25(7).
- Wardle, J., Herrera, M. L., Cooke, L., & Gibson, E. L. (2003). Modifying children's food preferences: the effects of exposure and reward on acceptance of an unfamiliar vegetable. *European journal of clinical nutrition*, 57(2), 341-348.
- Wardle, J., Waller, J., & Jarvis, M. J. (2002). Sex differences in the association of socioeconomic status with obesity. *American journal of public health*, 92(8), 1299-1304.

- Wardwell, L., Chapman-Novakofski, K., & Brewer, M. S. (2009). Effects of age, gender and chronic obstructive pulmonary disease on taste acuity. *International journal of food sciences and nutrition*, 60(sup6), 84-97.
- Wasén, E., Isoaho, R., Mattila, K., Vahlberg, T., Kivelä, S. L., & Irjala, K. (2003). Serum cystatin C in the aged: relationships with health status. *American journal of kidney diseases*, 42(1), 36-43.
- Watanabe, M., Asatsuma, M., Ikui, A., Ikeda, M., Yamada, Y., Nomura, S., & Igarashi, A. (2005). Measurements of several metallic elements and matrix metalloproteinases (MMPs) in saliva from patients with taste disorder. *Chemical senses*, 30(2), 121-125.
- Webb, J., Bolhuis, D. P., Cicerale, S., Hayes, J. E., & Keast, R. (2015). The relationships between common measurements of taste function. *Chemosensory perception*, 8(1), 11-18.
- Wetie, N., Armand, G., Wormwood, K. L., Charette, L., Ryan, J. P., Woods, A. G., & Darie, C. C. (2015). Comparative two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of the salivary proteome of children with autism spectrum disorder. *Journal of cellular and molecular medicine*, 19(11), 2664-2678.
- Wilkins, M. R., Sanchez, J. C., Gooley, A. A., Appel, R. D., Humphery-Smith, I., Hochstrasser, D. F., & Williams, K. L. (1996). Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnology and genetic engineering reviews*, 13(1), 19-50.
- Williamson, M. P. (1994). The structure and function of proline-rich regions in proteins. *Biochemical journal*, 297(Pt 2), 249.
- Who, J., & Consultation, F. E. (2003). Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. *World Health Organ Tech Rep Ser*, 916(i-viii).
- Wooding, S., Kim, U. K., Bamshad, M. J., Larsen, J., Jorde, L. B., & Drayna, D. (2004). Natural selection and molecular evolution in PTC, a bitter-taste receptor gene. *The American Journal of Human Genetics*, 74(4), 637-646.
- World Health Organization (2013). Country profiles on nutrition, physical activity and obesity in the 53 WHO European Region Member States Methodology and summary. WHO Regional Office for Europe
- Yackinous, C. A., & Guinard, J. X. (2002). Relation between PROP (6-n-propylthiouracil) taster status, taste anatomy and dietary intake measures for young men and women. *Appetite*, 38(3), 201-209.

- Yamaguchi, M., Takeda, K., Onishi, M., Deguchi, M., & Higashi, T. (2006). Non-verbal communication method based on a biochemical marker for people with severe motor and intellectual disabilities. *Journal of international medical research*, 34(1), 30-41.
- Yamamoto, Y., To, M., Hayashi, T., Shimizu, T., Kamata, Y., Saruta, J., ... & Tsukinoki, K. (2015). Intake of indigestible carbohydrates influences IgA response and polymeric Ig receptor expression in the rat submandibular gland. *British Journal of Nutrition*, 113(12), 1895-1902.
- Yamauchi, Y., Endo, S., Sakai, F., & Yoshimura, I. (2002). A new whole-mouth gustatory test procedure: I. Thresholds and principal components analysis in healthy men and women. *Acta oto-laryngologica*, 122(4), 39-48.
- Yamauchi, Y., Endo, S., & Yoshimura, I. (2002). A new whole-mouth gustatory test procedure: II. Effects of aging, gender and smoking. *Acta Oto-Laryngologica*, 122(4), 49-59.
- Yan, Q., & Bennick, A. (1995). Identification of histatins as tannin-binding proteins in human saliva. *Biochemical Journal*, 311(1), 341-347.
- Yang, Z. M., Chen, L. H., Zhang, M., Lin, J., Zhang, J., Chen, W. W., & Yang, X. R. (2015). Age Differences of Salivary Alpha-Amylase Levels of Basal and Acute Responses to Citric Acid Stimulation Between Chinese Children and Adults. *Frontiers in physiology*, 6.
- Yang, M., Sun, J., Zhang, T., Liu, J., Zhang, J., Shi, M. A., ... & Dolgiov, G. (2008). Deficiency and inhibition of cathepsin K reduce body weight gain and increase glucose metabolism in mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 28(12), 2202-2208
- Yao, Y., Berg, E. A., Costello, C. E., Troxler, R. F., & Oppenheim, F. G. (2003). Identification of protein components in human acquired enamel pellicle and whole saliva using novel proteomics approaches. *Journal of Biological Chemistry*, 278(7), 5300-5308.
- Yates, J. R., 3rd, A. Gilchrist, et al. (2005). "Proteomics of organelles and large cellular structures." *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6(9): 702-14.
- Yorbik, O., Mutlu, C., Ozturk, O., Altinay, D. K., Tanju, I. A., & Kurt, I. (2016). Salivary alpha amylase levels in youths with anxiety disorders. *Psychiatry research*, 235, 148-153.
- Yoshida, R., Niki, M., Jyotaki, M., Sanematsu, K., Shigemura, N., & Ninomiya, Y. (2013, March). Modulation of sweet responses of taste receptor cells. In *Seminars in cell & developmental biology* (Vol. 24, No. 3, pp. 226-231). Academic Press.

- Yoshida, R., Noguchi, K., Shigemura, N., Jyotaki, M., Takahashi, I., Margolskee, R. F., & Ninomiya, Y. (2015). Leptin suppresses mouse taste cell responses to sweet compounds. *Diabetes*, db141462.
- Yoshiko, K., & Roswith, R. (2012). Relationship between taste sensitivity and eating style in Japanese female university students. *Food and Nutrition Sciences*, 2012.
- Yoshinaka, M., Ikebe, K., Uota, M., Ogawa, T., Okada, T., Inomata, C., ... & Kamide, K. (2015). Age and sex differences in the taste sensitivity of young adult, young-old and old-old Japanese. *Geriatrics & gerontology international*.
- Zellner, D. A., Loaiza, S., Gonzalez, Z., Pita, J., Morales, J., Pecora, D., & Wolf, A. (2006). Food selection changes under stress. *Physiology & Behavior*, 87(4), 789-793.
- Zehetbauer, S., Wojahn, T., Hiller, K. A., Schmalz, G., & Ruhl, S. (2009). Resemblance of salivary protein profiles between children with early childhood caries and caries-free controls. *European journal of oral sciences*, 117(4), 369-373.
- Zhao, G. Q., Zhang, Y., Hoon, M. A., Chandrashekar, J., Erlenbach, I., Ryba, N. J., & Zuker, C. S. (2003). The receptors for mammalian sweet and umami taste. *Cell*, 115(3), 255-266.
- Zumoff, B. (1982). Relationship of obesity to blood estrogens. *Cancer research*, 42(8 Supplement), 3289s-3292s.

12.Anexos

Anexo I

Anexo I



Consentimento Informado

Para participação num estudo acerca do envolvimento de proteínas salivares na sensibilidade gustativa

Exma Sr(a):

Gostaríamos de obter a sua autorização para a realização de testes de sensibilidade gustativa e colheita de saliva mista, não estimulada, a qual se pretende analisar em termos de composição proteica.

Estes testes destinam-se serão feitos no âmbito de uma tese de doutoramento em Bioquímica, em que se pretende relacionar a composição da saliva com a percepção dos alimentos.

Os resultados são anónimos e serão utilizados apenas para investigação.

Por favor, coloque quaisquer dúvidas que tenha.

A handwritten signature in black ink that reads 'Elsa Cristina Gazona de Sousa Lamy'.

Elsa Lamy
(Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais Mediterrânicas
Universidade de Évora)

A handwritten signature in black ink that reads 'Cristina Pinheiro'.

Cristina Pinheiro
(Departamento de Zootecnia; Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais
Mediterrânicas, Universidade de Évora)

Autorizo

Não autorizo

Data _____

Assinatura _____

Cartão do Cidadão(Bilhete de identidade) número _____

Anexo II

Anexo II
QUESTIONÁRIO RECOLHAS DE SALIVA MISTA

Código	_____		
Idade: _____	Sexo:	Fem <input type="checkbox"/>	Masc. <input type="checkbox"/>
Peso: _____			
Altura: _____			
Sofre de sinusite?	Sim	<input type="checkbox"/>	Não <input type="checkbox"/>
Sofre de alergias respiratórias?	Sim	<input type="checkbox"/>	Não <input type="checkbox"/>
Sofre de diabetes mellitus?	Sim	<input type="checkbox"/>	Não <input type="checkbox"/>
Tem antecedentes familiares desta doença?	Sim	<input type="checkbox"/>	Não <input type="checkbox"/>
Gravidez?	Sim	<input type="checkbox"/>	Não <input type="checkbox"/>
Fuma ?	Sim	<input type="checkbox"/>	Não <input type="checkbox"/> Quantos cigarros/dia? _____
Consome álcool habitualmente?	Sim	<input type="checkbox"/>	Não <input type="checkbox"/> Tipo de bebida _____ Com que frequência? _____
Consome café?	Sim	<input type="checkbox"/>	Não <input type="checkbox"/> Quantos cafés/dia? _____
Há quanto tempo ingeriu alimentos?	_____		
Em que consistiu a última refeição antes desta recolha?	_____		
Entre a última refeição e esta recolha mastigou pastilhas elásticas ou rebuçados?	Sim	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Procedimento de recolha:

Beba 2 ou 3 goles de água, tentando "lavar" a boca

A partir daí, serão contados 5 minutos e, durante esse intervalo, deite toda a saliva produzida para o copo mantido em gelo (não engula saliva durante esse período de tempo).

Obrigada pela colaboração!

Anexo III

Anexo III



Avaliação da Sensibilidade Gustativa

(Parte I)

Código: _____

Idade _____ Sexo _____

Prove cada solução pela ordem indicada e registre na escala a intensidade da resposta ao estímulo.

Conjunto I	5232
	4283
	5310
Conjunto II	7271
	1498
	4807



Obrigada pela colaboração!

Data: / /



Avaliação da Sensibilidade Gustativa

(Parte II)

Código: _____

Idade _____ Sexo _____

Prove cada solução pela ordem indicada e intervalando cada prova com água.

Registe na tabela os códigos de cada uma das soluções, nas colunas assinaladas. Na coluna "água", se a solução lhe souber a água, e na coluna "diferente", se notar um outro sabor independentemente de o conseguir classificar.

Água	Diferente

Obrigada pela colaboração!

Data: / /

Anexo IV

Determinação dos pontos isoelectricos dos spots proteicos observados em géis 2-DE para tiras (IPG strips) de 13 cm, gama de pH 3-10 não linear

O ponto isoelectrico aparente de cada spot foi determinado através da medição do comprimento da tira e da posição da tira no gel de segunda dimensão, tendo em conta a largura deste. Seguidamente, através da posição de cada spot (como percentage da largura do gel) foi feita interpolação gráfica (Fig. 1).

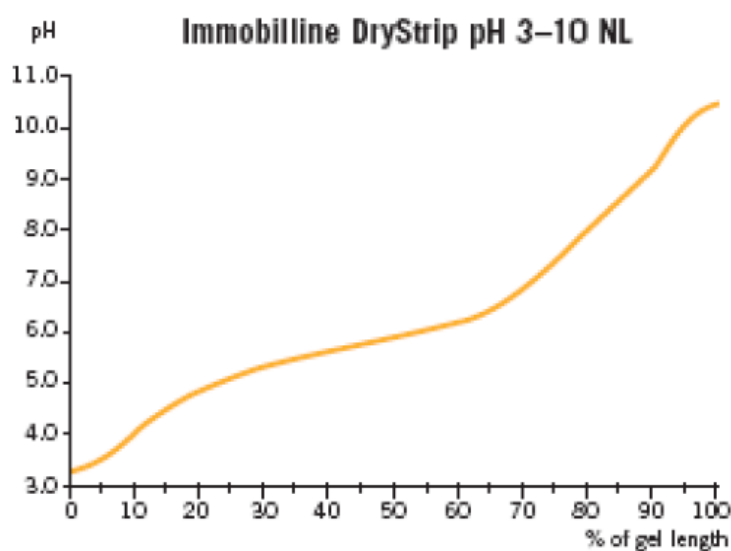


Fig. 1 – Gráfico de gradiente de pH. O gradiente de pH apresentado nesta figura é válido para condições próximas de 20°C em 8M ureia, usando IPGbuffer 3-10 NL. (Immobiline DryStrip gels Data file, 18-1177-60 AB, 2004-06; GE-Healthcare).

Anexo V

Tabela suplementar 1 – Possíveis PTMs em proteínas identificadas por MALDI FTICR

MS

Proteína	Nºacesso	Spot	Resíduos modificados				
			Glicosilação		Fosforilação		
			N-glyc.	O-glyc.	Tyr	Thr	Ser
Região C da cadeia K de imunoglobulina	P01834	10	---	---	78	56, 64, 70, 72	48, 51, 54, 60, 63, 66, 74, 100
		23	---	---	78	56, 64, 70, 72	48, 51, 54, 60, 63, 66, 74, 100
		27	---	63, 64, 66, 68, 69, 70, 72, 74, 100	78	56, 64, 70, 72	48, 51, 54, 60, 63, 66, 74, 100
		55	---	---	78	56, 64, 70, 72	48, 51, 54, 60, 63, 66, 74, 100
		56	---	---	78	56, 64, 70, 72	48, 51, 54, 60, 63, 66, 74, 100
		104	---	---	78	56, 64, 70, 72	48, 51, 54, 60, 63, 66, 74, 100
Anidrase carbónica VI	P23280	28	---	55, 62, 240, 242, 258, 266	25, 71, 105, 146, 176, 177, 263	24, 55, 69, 73, 94, 98, 103, 175, 220, 221, 258, 266	9, 93, 122, 124, 144, 148, 218, 240, 287
		63	---	55, 59, 144, 240, 242, 258, 266	25, 71, 105, 146, 176, 177, 263	24, 55, 69, 73, 94, 98, 103, 175, 220, 221, 258, 266	9, 93, 122, 124, 144, 218, 240, 287

		64	256-257	55, 144, 240, 242, 250, 266	25, 71, 105, 146, 176, 177	24, 55, 69, 73, 94, 98, 103, 175, 220, 221, 266	9, 93, 122, 124, 144, 218, 240, 250, 287
		65	256-264	55, 62, 240, 242, 258, 266	25, 71, 105, 146, 176, 177, 263	24, 55, 69, 73, 94, 98, 103, 175, 220, 221, 258, 266	9, 93, 122, 124, 144, 148, 218, 240, 287
Proteína induzida por prolactina	P12273	31	105-106	11, 14, 32	99, 103	---	11
		33	105-106	---	99, 103	---	11
		133	105-106	---	99, 103	60	11, 45
Região C da cadeia α-1 de imunoglobulina	P01876	3	---	2, 4, 5, 82, 84, 169, 213, 216, 218, 220, 256, 328	64	4, 16, 49, 71, 75, 84, 106, 109, 114, 117, 216, 218, 225, 249, 328	2, 5, 12, 38, 56, 60, 68, 94, 105, 111, 113, 119, 121, 128, 141, 169, 186, 187, 220, 256, 342
		81	---	2, 4, 5, 82, 84, 169, 213, 216, 218, 220, 256, 286, 289, 290, 291, 295, 296, 328	64	4, 16, 49, 71, 75, 84, 106, 109, 114, 117, 216, 218, 225, 249, 289, 290, 291, 328	2, 5, 12, 38, 56, 60, 68, 94, 105, 111, 113, 119, 121, 128, 141, 169, 186, 187, 220, 256, 286, 342

		85	332-353	2, 4, 5, 82, 84, 169, 213, 216, 218, 220, 256, 328, 337, 342, 351	---	4, 16, 49, 84, 106, 109, 114, 117, 216, 218, 225, 249, 328	2, 5, 12, 38, 94, 105, 111, 113, 119, 121, 128, 141, 169, 220, 256, 342
α-amilase salivar	P04745	58	---	81, 86, 99, 192, 214, 259, 260, 269, 279, 290, 351, 355, 356, 478, 485	17, 46, 133, 166, 262, 273, 362, 464	21, 86, 126, 129, 170, 269, 279, 391, 463	88, 123, 128, 132, 160, 192, 214, 234, 260, 290, 355, 356, 452, 485, 493, 497
		61	473-481	26, 27, 81, 86, 88, 99, 192, 214, 259, 260, 269, 279, 290, 355, 356, 478, 485	17, 46, 133, 262, 273, 362, 464	21, 26, 86, 126, 129, 269, 279, 391, 463	27, 81, 88, 123, 128, 132, 192, 214, 234, 260, 290, 355, 356, 452, 485, 493, 497
		72	473-481; 473-489;	81, 86, 88, 99, 214, 259, 260, 269, 287, 290, 355, 356, 478, 485	17, 46, 262, 273, 362, 464	21, 86, 269, 463	81, 88, 214, 260, 290, 355, 356, 452, 485
		73	473-481; 473-489	81, 86, 99, 192, 214, 259, 260, 269, 279, 290, 355, 356, 478, 485	17, 46, 133, 166, 262, 273, 362, 464	21, 86, 126, 129, 170, 269, 279, 463	81, 88, 123, 128, 132, 160, 192, 214, 234, 260, 290, 355, 356, 452, 485
		74	473-481; 473-489	81, 86, 88, 99, 192, 214, 259, 260, 269, 279, 290, 355, 356, 382, 478, 485	17, 46, 133, 262, 273, 362, 464	21, 86, 126, 129, 269, 279, 463	81, 88, 123, 128, 132, 192, 214, 234, 260, 290, 355, 356, 452, 485, 493, 497

		77	473-481; 473-498	81, 86, 88, 99, 158, 160, 192, 214, 259, 260, 269, 279, 290, 355, 356, 478, 485	17, 46, 133, 166, 262, 273, 362, 464	21, 86, 126, 129, 170, 269, 279, 463	81, 88, 123, 128, 132, 160, 192, 214, 234, 260, 485
		78	473-481; 473-489	81, 86, 88, 99, 192, 214, 259, 260, 269, 279, 290, 478, 485	17, 46, 133, 262, 273, 362, 464	21, 86, 126, 129, 269, 279, 463	81, 88, 123, 128, 132, 192, 214, 234, 260, 290, 452, 485
		79	473-478;	86, 88, 99, 192, 214, 269, 279, 290, 355, 356, 382, 478	17, 46, 133, 273, 362, 464	21, 86, 126, 129, 269, 279, 463	88, 123, 128, 132, 192, 214, 234, 290, 355, 356, 452
		120	473-481; 473-489	81, 86, 192, 214, 259, 260, 269, 279, 290, 478, 485	17, 46, 133, 262, 273, 362, 464	21, 86, 126, 129, 269, 279, 463	81, 123, 128, 132, 192, 214, 234, 260, 290, 452, 485, 493, 497

N-Glyc- N-Glicosilação; O-Glyc- O-Glicosilação; Tyr- Tirosina; Thr- Trionina; Ser- Serina

Anexo VI



CONSENTIMENTO INFORMADO PARA PARTICIPAÇÃO EM ESTUDO DE INVESTIGAÇÃO

Influência da Sensibilidade Gustativa nas Escolhas Alimentares e Impacto na Saúde em Crianças do 1º Ciclo do Ensino Básico: Pesquisa de Marcadores na Saliva

Caro/a Encarregado/a de Educação,

O Núcleo Regional do Alentejo da Plataforma contra a Obesidade, da Administração Regional de Saúde do Alentejo, em colaboração com a Universidade de Évora, está a realizar um estudo sobre “Influência da Sensibilidade Gustativa nas Escolhas Alimentares e Impacto na Saúde em Crianças do 1º Ciclo do Ensino Básico: Pesquisa de Marcadores na Saliva”.

Os alunos e as alunas serão convidados/as a participar mediante o consentimento informado dos/as respetivos/as Encarregados/as de Educação. A sua participação consiste na resposta a um questionário sobre hábitos de atividade física e hábitos alimentares, na avaliação de sensibilidade gustativa através da prova de soluções doces e amargas, bem como na recolha de saliva, cuja constituição proteica será analisada. Os alunos e as alunas serão também avaliados/as, por um profissional de saúde, quanto ao seu peso corporal e altura, em roupa leve e/ou interior.

A escola que o seu/sua filho/a frequenta é uma das escolas selecionadas para o referido estudo. Neste sentido, solicitamos a sua autorização para que o seu/sua educando/a possa participar neste projeto e informamos que estamos disponíveis para qualquer esclarecimento através do seguinte e-mail ecls@uevora.pt.

No decorrer do estudo será assegurado o devido respeito pelos cuidados éticos e deontológicos exigidos - o processo será mantido confidencial e os dados obtidos irão servir apenas para os efeitos desta investigação, não sendo tratados de forma individual mas sim no seu conjunto. Os dados serão processados de forma estatística e posteriormente divulgados em evento e/ou revista científica. Desejamos muito que participe neste projeto.

Desde já agradecemos a sua disponibilidade.



Autorização:

Eu, _____ tendo lido e compreendido o objetivo e os procedimentos do estudo, **autorizo** o/a meu/minha educando/a, _____ (nome do aluno) _____ (ano) _____ (turma) a participar neste projeto e que os dados recolhidos sejam utilizados para análise.

Data: ___/___/_____ Assinatura: _____

Anexo VII

©FRONTINO©



GERONIMO



Infiltrado

Anexo VIII



QUESTIONÁRIO

HÁBITOS DE PRÁTICA DE ATIVIDADE FÍSICA E PREFERÊNCIAS E HÁBITOS ALIMENTARES

Parte I. Identificação

1. Sexo (assinala com uma X) : Feminino Masculino
2. Indica o número de pessoas que vivem na tua casa : _____
3. Profissão da mãe: _____ 3.1. Situação atual: Empregada Desempregada
4. Profissão do pai: _____ 4.1. Situação atual: Empregado Desempregado
5. Grau de parentesco do/a encarregado/a de educação: _____
- Se o/a encarregado/a de educação **não** for o pai ou a mãe:
6. Profissão do/a encarregado/a de educação: _____
- 6.1. Situação atual : Empregado/a Desempregado/a

		7. Mãe	8. Pai	9. Encarregado/a de educação (se não for o pai ou a mãe)
Nível de escolaridade (assinale X)	Sem nenhum nível de escolaridade			
	4º ano ou 6º ano de escolaridade (ou equivalente)			
	9º ano de escolaridade (ou equivalente)			
	Ensino secundário			
	Ensino pós-secundário não superior (não conferente de grau académico)			
	Bacharelato, Licenciatura ou Mestrado			
	Doutoramento			

Parte II – Hábitos de prática de atividade física

2.1. Praticas habitualmente desporto ou atividade física fora da escola (num clube, ginásio ou associação)? : Sim Não (assinala com uma X)

2.1.1 Se respondeste SIM indica no seguinte quadro quais são esses desportos ou atividades físicas e o nº de vezes que os praticas por semana:

Nome da atividade física que praticas	Nº de vezes por semana

Para responderes às próximas perguntas sobre alguns dos teus hábitos nos tempos livres e nas refeições vais escolher, para cada afirmação ou pergunta, qual a resposta que está mais de acordo com aquilo que costumavas fazer. Há quatro respostas possíveis:

Sempre / Todos os dias da semana	Muitas vezes / 4-6 dias por semana	Poucas vezes / 2-3 dias por semana	Nunca ou quase nunca / 0-1 dia por semana
---	---	---	--

Exemplo 1: Dormir. Como dormes todos os dias, devias assinalar uma X no 1º quadradinho que corresponde à resposta “Sempre / Todos os dias da semana”.

	Sempre / Todos os dias da semana	Muitas vezes / 4-6 dias por semana	Poucas vezes / 2-3 dias por semana	Nunca ou quase nunca / 0-1 dia por semana
Dormir.	X			

Exemplo 2: Ir brincar a casa dos amigos. Se é habitual ires brincar apenas duas ou três vezes por semana a cada dos teus amigos, devias assinalar uma X no 3º quadradinho que corresponde à resposta “Poucas vezes / 2-3 dias por semana”.

	Sempre / Todos os dias da semana	Muitas vezes / 4-6 dias por semana	Poucas vezes / 2-3 dias por semana	Nunca ou quase nunca / 0-1 dia por semana
Ir brincar a casa dos amigos.			X	

Experimenta agora responderes com o seguinte exemplo:

	Sempre / Todos os dias da semana	Muitas vezes / 4-6 dias por semana	Poucas vezes / 2-3 dias por semana	Nunca ou quase nunca / 0-1 dia por semana
Ajudar a pôr a mesa para o jantar.				

2.2. Indica a frequência com que realizas, fora da escola, as seguintes atividades (*assinala com uma X o nível da escala que melhor corresponde à tua resposta*):

	Sempre / Todos os dias da semana	Muitas vezes / 4-6 dias por semana	Poucas vezes / 2-3 dias por semana	Nunca ou quase nunca / 0-1 dia por semana
2.2.1. Ver televisão.				
2.2.2. Jogar computador / navegar na internet / facebook.				
2.2.3. Jogar em consolas (playstation, Wii, etc).				
2.2.4. Ler.				
2.2.5. Brincar na rua com os/as amigos/as , andar de bicicleta ou skate)				
2.2.6. Fazer compras ou passear a caminhar.				

Parte III- Preferências e hábitos alimentares


3.1 Indica a frequência com que realizas as seguintes ações (*assinala com um O o número da escala que melhor corresponde à tua resposta*):

	Sempre / Todos os dias da semana	Muitas vezes / 4-6 dias por semana	Poucas vezes / 2-3 dias por semana	Nunca ou quase nunca / 0-1 dia por semana
3.1.1 Tomar o pequeno almoço em casa.				
3.1.2. Fazer as refeições principais (exº jantar) com o resto da família.				
3.3.3. Comer uma comida diferente do resto da família durante as refeições principais (exº jantar).				
3.3.4 Comer doces ou beber refrigerantes entre as refeições				
3.3.4. Ver televisão enquanto se come.				


Na próxima questão vais encontrar uma lista de alimentos. Para cada um desses alimentos indica o quanto gostas dele, escolhendo a tua resposta entre as seguintes cinco opções:

Gosto muito/ Adoro	Gosto	Gosto pouco	Não gosto/ Detesto	Não sei/ Não conheço/ Sou alérgico/a
4	3	2	1	☹


Exemplo 1: iogurte natural. Se "gostares muito /adorares" assinalas um círculo à volta do nº 4, o mais alto da escala.

		Gosto muito/ Adoro	Gosto	Gosto pouco	Não gosto/ Detesto	Não sei/ Não conheço/ Sou alérgico/a
		4	3	2	1	☹
iogurte natural			3	2	1	☹






Exemplo 2: Ananás. Se "gostares pouco" assinalas um círculo à volta do nº 2 da escala.











		Gosto muito/ Adoro	Gosto	Gosto pouco	Não gosto/ Detesto	Não sei/ Não conheço/ Sou alérgico/a
		4	3	2	1	☹
Ananás		4	3	2	1	☹







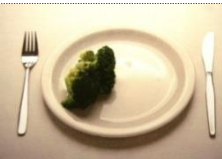


Experimenta agora responderes com o seguinte exemplo:










		Gosto muito/ Adoro	Gosto	Gosto pouco	Não gosto/ Detesto	Não sei/ Não conheço/ Sou alérgico/a
		4	3	2	1	☹
Grão cozido		4	3	2	1	☹

3.2. Indica o teu nível de satisfação para cada um dos seguintes alimentos (assinala com um **O** o número da escala que melhor corresponde à tua resposta):

			Gosto muito/ Adoro	Gosto	Gosto pouco	Não gosto/ Detesto	Não sei/ Não conheço/ Sou alérgico/a ☹
			4	3	2	1	
1	Morangos		4	3	2	1	☹
2	Maçãs		4	3	2	1	☹
3	Espinafres		4	3	2	1	☹
4	Cenouras cozidas		4	3	2	1	☹
5	logurtes de aromas		4	3	2	1	☹
6	Couves		4	3	2	1	☹
7	Couve-de-bruxelas		4	3	2	1	☹
8	Chocolate		4	3	2	1	☹

			Gosto muito/ Adoro 4	Gosto 3	Gosto pouco 2	Não gosto/ Detesto 1	Não sei/ Não conheço/ Sou alérgico/a ☹
9	Laranjas		4	3	2	1	☹
10	Arroz		4	3	2	1	☹
11	Ice-tea		4	3	2	1	☹
12	Nabiças		4	3	2	1	☹
13	Kiwis		4	3	2	1	☹
14	Espargos		4	3	2	1	☹
15	Batatas fritas		4	3	2	1	☹
16	Couve-flôr		4	3	2	1	☹
17	Cenoura crua		4	3	2	1	☹
18	Agriões		4	3	2	1	☹

			Gosto muito/ Adoro 4	Gosto 3	Gosto pouco 2	Não gosto/ Detesto 1	Não sei/ Não conheço/ Sou alérgico/a ☹️
19	Leite		4	3	2	1	☹️
20	Pêras		4	3	2	1	☹️
21	Meloa		4	3	2	1	☹️
22	Melancia		4	3	2	1	☹️
23	Batatas cozida		4	3	2	1	☹️
24	Bananas		4	3	2	1	☹️
25	Bróculos		4	3	2	1	☹️
26	Leite com chocolate		4	3	2	1	☹️
27	Pepino		4	3	2	1	☹️

			Gosto muito/ Adoro	Gosto	Gosto pouco	Não gosto/ Detesto	Não sei/ Não conheço/ Sou alérgico/a
			4	3	2	1	☹️
28	Gomas		4	3	2	1	☹️
29	Ervilhas		4	3	2	1	☹️
30	Massas		4	3	2	1	☹️
31	Pão		4	3	2	1	☹️
32	Cereais de pequeno almoço		4	3	2	1	☹️
33	Coca-cola		4	3	2	1	☹️
34	Tomate		4	3	2	1	☹️
35	Bolachas e bolos		4	3	2	1	☹️
36	Uvas		4	3	2	1	☹️

As tuas respostas foram uma grande ajuda.

Muito obrigado 😊.