MARIA CAROLINA MARTINS MUSSI

Parâmetros salivares, proteoma e saúde bucal na síndrome de Moebius

São Paulo

2015

MARIA CAROLINA MARTINS MUSSI

Parâmetros salivares, proteoma e saúde bucal na síndrome de Moebius

Versão Corrigida

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, para obter o título de Doutor, pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

Área de Concentração: Patologia e Estomatologia Básica e Aplicada

Orientador: Profa. Dra Marina Helena Cury Gallottini

São Paulo

2015

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo-na-Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Mussi, Maria Carolina Martins.

Parâmetros salivares, proteoma e saúde bucal na síndrome de Moebius / Maria Carolina Martins Mussi ; orientador Marina Helena Cury Gallottini. -- São Paulo, 2015.

131 p. : il., tab. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) -- Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Área de Concentração: Patologia e Estomatologia Básica e Aplicada. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão corrigida

1. Síndrome de Möbius. 2. Paralisia facial. 3. Saliva. 4. Proteínas. 5. Peptídeos.
I. Gallottini, Marina Helena Cury. II. Título.

Mussi MCM. Estudo das alterações salivares em pessoas com a síndrome de Moebius. Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Odontologia.

Aprovado em: / /2015

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a)._____

Instituição:_____ **Julgamento:**_____

Prof(a). Dr(a)._____

Instituição:_____ **Julgamento:**_____

Prof(a). Dr(a)._____

Instituição:_____ **Julgamento:**_____

Prof(a). Dr(a)._____

Instituição:_____ **Julgamento:**_____

Prof(a). Dr(a)._____

Instituição:_____ **Julgamento:**_____

Dedico esse trabalho aos meus pais, **César** e **Neusa**, à minha irmã **Juliana**, aos meus familiares e aos amigos que me apoiaram durante a realização deste trabalho e aos pacientes que tanto me auxiliaram.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, **César** e **Neusa**, pelo amor incondicional e por estarem sempre presentes, tornando a distância algo insignificante diante do amor que sinto por vocês. Todo caminho se torna menos árduo quando sabemos que as pessoas que amamos estão conosco. Obrigada por me ensinarem tudo que sei hoje e a me tornar a pessoa que sou. Amo muito vocês.

À minha irmã, **Juliana**, por todo apoio e companheirismo. Por me ensinar todos os dias algo novo da maneira mais doce possível. Obrigada por toda cumplicidade e por estar sempre ao meu lado para enfrentarmos juntas as dolorosas questões da vida! Te amo incondicionalmente e sei que sempre estaremos juntas. Ao meu cunhado e amigo, **Bruno**, que se tornou em tão pouco tempo mais que um amigo, um irmão.

Ao meu irmão **Gabriel**, por me tornar uma pessoa mais leve e alegre. Agradeço por estar sempre presente, por me por fazer enxergar a vida com menos seriedade e me ajudar a dar menor valor aos problemas. Mesmo longe você continua sendo muito importante para mim. Amo você.

Ao meu namorado **Cris**, por me apoiar de maneira tão carinhosa sempre. Agradeço por tornar tudo que passei mais leve e sereno. Saiba que você tem me ensinado demais e tenho me tornado uma pessoa melhor ao seu lado! Obrigada pelo ombro quando precisei chorar e pela ajuda irrestrita, sempre me auxiliando a ver que algo bom espera por nós. Amo você.

Aos meus **tios, tias, primos, primas** e **avós** por sempre estarem por perto mesmo distantes. Em especial ao meu tio **Roberto** e à minha tia **Cristina**, por sua imensa alegria e companheirismo, à **Maiara** por toda doçura, ao **Cauã** por toda alegria proporcionada e a minha avó, **Nena**, pelo carinho e cuidado. Amo muito todos vocês e sei me apoiarão sempre. Aos meus tios, **Paulo** e **Made**, por estarem sempre torcendo por mim. Obrigado por estarem sempre presentes e fornecerem tanto apoio e ajuda. Ao meu amigo **Fábio**, por todo apoio, incentivo e compreensão. Algumas pessoas levamos para a vida toda e você é uma delas.

À minha grande companheira inseparável, **Fer Pigatti**, por ter me ajudado tanto na realização desse trabalho. Mais que isso, por ser minha parceira de angustias, sonhos e frustrações. Agradeço por me levantar em todos os momentos em que me senti fraca e pequena diante dos problemas. Sei que poderemos contar uma com a outra para sempre afinal “11 anos não são 11 meses”. E como Vinicius de Moraes menciona em uma de suas poesias: “A gente

não faz amigos, reconhece-os”. Agradeço a toda sua família, em especial ao **Gabriel**, que foi tão solícito e me ajudou demais com sua habilidade em Excel.

As minhas irmãs de time (**Wallys Rugby**) por todos os bons momentos passados juntas. Pelo apoio e compreensão no final da tese, e por animarem minhas noites com risadas, músicas e dancinhas.

A minha orientadora, **Profa. Dra. Marina Gallottini**, por todo o tempo e atenção destinados a mim. Agradeço imensamente por toda confiança desde o início e por me fazer acreditar em mim mesma. Levo dessa convivência uma imensa gratidão e uma admiração enorme por sua dedicação aos seus alunos, pacientes e pela pesquisa. Vejo em você muitas qualidades das quais almejo alcançar um dia.

A **Prof. Dr. Walter Siqueira**, por ter aberto as portas de seu laboratório e ter me tratado com imenso carinho e atenção. Mais de que um professor, conheci uma pessoa que admiro e que se tornou um grande amigo. Agradeço demais por todas explicações sobre bioquímica, sobre as conversas, conselhos e por sempre me acalmar. Tive um dos melhores anos da minha vida no Canadá e grande parte se deve à estrutura proporcionada por você. Agradeço imensamente também à **Michelle**, ao **Joseph** e ao **Thomas**, por me receberem tão bem e me fazerem sentir em casa, mesmo estando a quilômetros do Brasil. Sou eternamente grata a vocês e levo comigo ótimas lembranças. Sinto muita saudade das confraternizações com vocês.

For all the Walter Siqueira's lab staff: Flavia, Tayebbeh, David, Cindy, Yuliya, Cathy and Raj, I thank you all for making the work environment so funny and pleasant. Thanks a lot for the companionship and motivation. I deeply thank Heide to shelter myself so nicely and treat me like a brazilian daughter. Thank you so much for the available suport and affection. I miss you all. You guys live in my heart.

Através de palavras se torna praticamente impossível agradecer ao **Eduardo Moffa** e à **Marcia Tanaka**. Obrigada por me receberem tão bem e serem essenciais para a minha adaptação. Vocês foram parceiros de passeios, de momentos de tristeza e, principalmente, de muita risada e companheirismo. Com vocês ri, chorei, briguei, mas mais importante, vivi momentos que guardarei para sempre no meu coração. Obrigada ainda por todo suporte e por sanar minhas dúvidas em relação a tese, vocês foram essenciais. Sei que ainda nos encontramos muitas vezes.

Aos professores da disciplina de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, **Profa. Dra. Suzana Cantanhede Orsini Machado de Sousa**, **Prof. Dr. Fábio Daumas Nunes**, **Prof. Dr. Décio dos Santos Pinto Júnior**, **Profa. Dra.**

Marilia Trierveiler Martins, Profa. Dra. Andrea Mantesso Pobocik e Profa. Dra. Karem Lopez Ortega pelos ensinamentos e atenção voltados aos alunos, contribuindo para nosso engrandecimento.

À **Zilda, Néia, Vinicius, Fátima e Nair** por toda disponibilidade e atenção dirigidos a todos, sem distinção. Aos técnicos do laboratório de Patologia Bucal, **Juvani, Adriana e Elisa** por toda eficiência e convívio.

Ao querido amigo, **Bruno**, pelos conselhos, pelo estímulo no final da tese, pelo carinho e por me fazer rir quando queria chorar. Agradeço à **Karin**, por sempre me ajudar e facilitar tudo que estava ao seu alcance. Obrigada por ser tão solícita e uma amiga que tenho imenso carinho e admiração. Obrigada por sempre me colocar para cima, saiba que te admiro demais amiga. Agradeço à **Gabrielle** que me ajudou durante todas as etapas desse trabalho e sempre se mostrou tão interessada e disponível. O curso deste caminho tornou-se muito mais leve por saber que podia contar com vocês.

Agradeço à **Priscila**, minha grande amiga, pelos inúmeros ensinamentos e por sempre estar ao meu lado. Já passamos muitas coisas que nos fizeram crescer e aprender juntas a lidar com as adversidades. Os problemas se tornam menos intimidantes por saber que posso contar com pessoas como você. Você sabe o quanto é especial. Amo você.

Às funcionárias no Centro de Atendimento a Pacientes Especiais, **Gilmara, Sandra, Isabel, Marlene, Néia, Cristina, Jeane e Andressa** pelo convívio tão alegre e por toda atenção e carinho destinados à mim. Agradeço à **Talita** por toda ajuda e disponibilidade durante a realização desse trabalho.

Aos demais colegas de **Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia** da Universidade de São Paulo pela convivência e trocas de experiências nesses anos.

Aos pacientes que participaram da pesquisa. Vocês foram fundamentais, não apenas pelas doações de material, mas por me mostrar dia dia o quanto ainda tenho a evoluir. Espero, do fundo coração, que os resultados aqui apresentados possam servir para um melhor entendimento e aceitação dessa condição. Muito obrigada pela paciência e disposição.

“Que nada nos limite, que nada nos defina que nada nos sujeite.

Que a liberdade seja nossa própria substância,

já que viver é ser livre.”

Simone de Beauvoir

RESUMO

Mussi MCM. Parâmetros salivares, proteoma e saúde bucal na síndrome de Moebius [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2015. Versão Corrigida.

A síndrome de Moebius (SM) é uma diplegia congênita rara caracterizada por paralisia total ou parcial do VI e VII nervos cranianos, que leva à ausência ou deficiência dos movimentos dos músculos envolvidos na mímica facial e ao estrabismo convergente. As características bucais descritas nesses indivíduos incluem o palato ogival, micrognatia, malformação de língua, filtro curto, falta de coaptação de lábios, e maior incidência de lesões de cárie. O objetivo deste estudo foi avaliar as características salivares quantitativas e qualitativas, incluindo o proteoma salivar, de indivíduos com SM, associá-las com a saúde bucal, e compará-las com as características salivares de um grupo controle, não afetado pela SM. Foram incluídos 15 indivíduos com SM e 15 controles. O comprometimento facial dos indivíduos com a SM foi avaliada e graduada em scores 0,1 ou 2, uni ou bilateral, para os nervos II, III, IV, V, VI, VII e XI. Os pesquisadores determinaram o índice de cárie (ICDAS), de doença periodontal (PSR) e de placa (Silness Løe) nos dois grupos de estudo. Também realizaram coletas de saliva total não estimulada, estimulada e parotídea bilateral, sendo o fluxo salivar estabelecido em ml/min. A capacidade tampão foi avaliada na saliva total estimulada através da titulação de HCl 0,01N. A atividade de α -amilase nas amostras foi medida através da produção de maltose. Para a análise proteômica optou-se pela divisão das amostras de saliva de acordo com o fluxo em ml/min. Desta forma, para cada grupo, estudo e controle, os 4 tipos de saliva (estimulada, não estimulada, parotídea esquerda, parotídea direita) foram subdivididos de acordo com baixo fluxo (abaixo da média do grupo) ou alto fluxo (acima da média do grupo), resultando em 16 subgrupos. O proteoma foi obtido por duas metodologias distintas, a primeira a partir da cromatografia líquida espectrometria de massas e a segunda que utilizou a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) associada à eletroforese em gel de poliacrilamida (native cationic). A ocorrência das lesões de cárie foi significativamente mais alta entre os participantes com SM ($p > 0,05$) no corte 2, bem como a ocorrência de doença periodontal ($p > 0,05$), quando comparado ao grupo controle. Não houve diferença no índice de placa entre os grupos. A análise proteômica mostrou diminuição de

cistatinas B, S e SN nos indivíduos com SM. Não houve diferença no perfil proteico entre os grupos de baixo e de alto fluxo salivar, para indivíduos com SM e controle. Houve aumento na quantidade de amilase salivar em e de histatina 1,3 e 5 em indivíduos com SM. Concluimos que indivíduos com SM apresentam diminuição de fluxo salivar, de capacidade tampão e alterações proteicas que colocam esses indivíduos em situação de maior risco para cárie e para doença periodontal.

Palavras-chave: Síndrome de Moebius. Paralisia Facial. Saliva. Proteínas e Peptídeos Salivares. Proteoma.

ABSTRACT

Mussi MCM. Salivary parameters, proteome and oral health in Moebius syndrome [thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2015. Versão Corrigida.

The Moebius syndrome (MS) is a rare congenital diplegia characterized by total or partial palsy of the VI and VII cranial nerves, leading to the absence or disability of the movements of facial expression muscles and to convergent strabismus. The oral features described in these individuals include high-arched palate, micrognathia, tongue malformation, short filter, lack of lips coaptation, and higher incidence of caries lesions. The aim of this study was to evaluate the quantitative and qualitative salivary characteristics, including the salivary proteome of individuals with MS, associate them with the oral health, and compare them to the salivary characteristics of a control group, unaffected by SM. We included 15 subjects with MS and 15 controls. The facial involvement of individuals with MS was evaluated and graded on scores 0, 1 or 2, uni or bilateral to the nerves II, III, IV, V, VI, VII and XI. The researchers established the caries (ICDAS), periodontal disease (PSR) and plaque (Silness Loe) indexes in both groups. We also performed unstimulated, stimulated and bilateral parotid saliva collections, and salivary flow was calculated (ml / min). The buffer capacity was measured in stimulated saliva by titration of 0.01N HCl. The α -amylase activity was determined by maltose production. For proteomic analysis it was decided to split the saliva samples in accordance with the flow in ml/min. Thus, for each group, study and control, the 4 types of saliva (stimulated, unstimulated, left parotid, right parotid) were subdivided according to low flow (below the group average) or high flow (above average group), resulting in 16 subgroups. The proteome was obtained by two different methodologies, the first was liquid chromatography mass spectrometry and the second was sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) associated with cationic PAGE. The occurrence of caries lesions, related to cut-off 2, as well as the occurrence of periodontal disease, was significantly higher ($p > 0.05$) in participants with MS when compared to the control group. There was no statistical difference in plaque index between groups. Proteomics analysis showed decrease of cystatin B, S and SN in individuals with MS. There was no difference in protein profile between the low and high salivary flow groups, for

individuals with MS and control. There was an increase in the amylase amount and histatin 1, 3 and 5 in individuals with MS. We concluded that individuals with MS present decreased salivary flow, decreased buffer capacity and protein alterations that place these individuals at increased risk for caries and periodontal disease.

Keywords: Mobius Syndrome. Facial Paralysis. Saliva. Salivary Proteins and Peptides. Proteome.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 - Aspectos faciais de indivíduos com SM.....	23
Figura 5.1 - Valores preditos para o Corte 1 do ICDAS segundo NE (ml/min) e Grupo, fixando PE em 0,3 ml/min	63
Figura 5.2 - Valores preditos para o Corte 2 do ICDAS segundo NE (ml/min) e Grupo, fixando PE em 0,3 ml/min	63
Figura 5.3 - Atividade da enzima amilase salivar (U/mg) para indivíduos do grupo de SM e controle (*P<0,05)	65
Figura 7.1 Diagrama de Venn mostrando a relação do número de proteínas identificadas em cada grupo e suas interrelações; G1- Saliva não estimulada de SM (fluxo acima); G2- - Saliva não estimulada de SM (fluxo abaixo); G9- Saliva não estimulada dos controles (fluxo acima), G10- Saliva não estimulada dos controles (fluxo abaixo).	73
Figura 7.2 Diagrama de Venn mostrando a relação do número de proteínas identificadas em cada grupo e suas interrelações; G3- Saliva estimulada de SM (fluxo acima); G4- Saliva estimulada de SM (fluxo abaixo); G11- Saliva estimulada dos controles (fluxo acima), G12- Saliva estimulada dos controles (fluxo abaixo).	74
Figura 7.3- Diagrama de Venn mostrando a relação do número de proteínas identificadas em cada grupo e suas interrelações; G5- Saliva parotídea direita de SM (fluxo acima); G6- Saliva parotídea direita de SM (fluxo abaixo); G13- Saliva parotídea direita dos controles (fluxo acima), G14- Saliva parotídea direita dos controles (fluxo abaixo)	75
Figura 7.4 - Diagrama de Venn mostrando a relação do número de proteínas identificadas em cada grupo e suas interrelações; G7- Saliva parotídea esquerda de SM (fluxo acima); G8- Saliva parotídea esquerda de SM (fluxo abaixo); G15- Saliva parotídea esquerda dos controles (fluxo acima), G16- Saliva parotídea esquerda do grupo controle (fluxo abaixo)	76
Figura 7.5 - Diagramas de Venn mostrando a relação do número de proteínas identificadas em cada grupo e suas interrelações.....	77

Figura 7.6 - Bandas avaliadas através de SDS-PAGE para saliva não estimulada de indivíduos com SM (G1 e G2) e controles (G1 e G9).....	80
Figura 7.7 - Bandas avaliadas através de SDS-PAGE para saliva estimulada de indivíduos com SM (G3 e G4) e controles (G11 e G12).....	81
Figura 7.8 - Bandas avaliadas através de SDS-PAGE para saliva parotídea esquerda e direita (acima da média de fluxo do grupo) de indivíduos com SM (G5 e G7) e controles (G13 e G15)	82
Figura 7.9 - Bandas avaliadas através de SDS-PAGE para saliva parotídea esquerda e direita (abaixo da média de fluxo do grupo) de indivíduos com SM (G6 e G8) e controles (G14 e G16)..	83
Figura 7.10 - SDS-PAGE mostrando identificação das respectivas bandas submedidas ao nLC-ESI-MS/MS	84
Figura 7.11 - Quantificação de histatina 1, 3 e 5 (em µg) provenientes em 25 µg de saliva parotídea esquerda e direita acima da média de fluxo do grupo (G5, G13, G7, G15) através da eletroforese em gel de poliacrilamida (native cationic).	85
Figura 7.12 - - Quantificação de histatina 1, 3 e 5 (em µg) provenientes em 25 µg de saliva parotídea esquerda e direita acima da média de fluxo do grupo (G6, G14, G8, G16) através da eletroforese em gel de poliacrilamida (native cationic).	85
Figura 7.13 - Teste de ELISA com anticorpo anti-amilase (1:1000). A chave mostra a comparação realizada entre os grupos e * representa $p < 0,05$. Grupos de indivíduos com SM (G1 e G8) e controle (G9 e G16)	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 5.1 - Dados demográficos dos participantes do estudo	58
Tabela 5.2-Médias do fluxo da saliva total não estimulada (NE), total estimulada (ES) e das glândulas parótidas direita (PD) e esquerda (PE), pH inicial, capacidade tampão da saliva ES, e índices de doença periodontal (PSR), placa e ICDAS de indivíduos do grupo Mebius e controle	60
Tabela 5.3 -Correlação entre achados clínicos como índice de cárie ICDAS (Cortes 1 a 5) com aspectos salivares	62
Tabela 7.1 Comparação entre dois grupos onde foi determinado o total de proteínas quantificadas, a quantidade de proteínas que apresentaram razão de abundância. Com base na razão entre os grupos foi determinada a quantidade de proteína mais abundante em cada grupo (<1,25 ou >0,75).....	78
Tabela 7.2 Comparação, em porcentagem, das bandas de saliva não estimulada. O primeiro grupo de cada comparação (grupo em negrito) foi considerado como controle, ou seja, 100%. Desse modo, valores considerados positivos significam que o segundo grupo apresentou maior concentração na banda analisada (B1 a B13).....	80
Tabela 7.3- Comparação, em porcentagem, das bandas de saliva estimulada. O primeiro grupo de cada comparação (grupo em negrito) foi considerado como controle, ou seja, 100%. Desse modo, valores considerados positivos significam que o segundo grupo apresentou maior concentração na banda analisada (B1 a B14).....	81
Tabela 7.4 -Comparação, em porcentagem, das bandas de saliva parotídea esquerda e direita com fluxo acima da média do grupo. O primeiro grupo de cada comparação (grupo em negrito) foi considerado como controle, ou seja, 100%. Desse modo, valores considerados positivos significam que o segundo grupo apresentou maior concentração na banda analisada (B1 a B14)	82
Tabela 7.5- Comparação, em porcentagem, das bandas de saliva parotídea esquerda e direita com fluxo abaixo da média do grupo. O primeiro grupo de cada comparação	

(grupo em negrito) foi considerado como controle, ou seja, 100%. Desse modo, valores considerados positivos significam que o segundo grupo apresentou maior concentração na banda analisada (B1 a B14) 83

Tabela 7.6- Quantidade de histatinas 1,3 e 5 (μg) na saliva parótidea dos grupos de Moebius e controle com fluxo salivar acima da média (G5, G13, G7 e G15)..... 84

Tabela 7.7- Quantidade de histatinas 1,3 e 5 (μg) na saliva parótidea dos grupos de Moebius e controle com fluxo salivar acima da média (G6, G14, G8 e G16)..... 84

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

SM	Síndrome de Moebius
HOXB 1	homeobox protein Hox-B1
Ca ²⁺	íon cálcio
HCO ₃ ⁻	bicarbonato
K ⁺	íon potássio
Cl ⁻	íon cloro
Na ⁺	íon sódio
H ₂ CO ₃	ácido carbônico
MUC 7	mucina MG2
kDa	kilodaltons
MUC 1	mucina MG1
CAPE	Centro de Atendimento a Pacientes Especiais
FOUSP	Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo
PSR	Periodontal Screening and Recording
ICDAS	International Caries Detection and Assessment System
N	normal
SDS-PAGE	dodecil-sulfato de sódio (SDS) de poliacrilamida (PAGE)
µl	microlitro
M	molar
mM	Milimolar
µg	microgramas
ml	mililitro
ml/min	mililitro por minuto
pH	potencial de hidrogênio
kDa	kilodaltons
MALDI-MS	Ionização e dessorção a laser assistida por matriz associadas ao espectrômetro de massas
DTT	Ditiotreitol
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
p	nível de significância

LISTA DE SÍMBOLOS

%	porcentagem
C°	graus Celsius
>	maior
<	menor

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	21
2	REVISÃO DE LITERATURA	22
2.1	Histórico da Síndrome de Moebius	22
2.2	Crterios de diagnóstico e diagnósticos diferenciais da SM	23
2.3	Achados orofaciais descritos na SM.....	25
2.4	Etiopatogenia da SM	26
2.5	Saliva	28
2.5.1	Secreção salivar	28
2.5.2	Inervação das glândulas salivares	30
2.5.3	Propriedades e componentes da saliva	32
2.5.4	Proteínas salivares	36
3	PROPOSIÇÃO.....	43
4	MATERIAL E MÉTODOS	44
4.1	Avaliação clínica	44
4.1.1	Higiene bucal	45
4.1.2	Saúde periodontal	45
4.1.3	Índice de cárie.....	46
4.1.4	Avaliação das características faciais.....	47
4.2	Análise quantitativa e qualitativa da saliva.....	47
4.2.1	A coleta da saliva total não estimulada.....	48
4.2.2	A coleta da saliva total estimulada	48
4.2.3	A coleta da saliva estimulada da parótida.....	48
4.2.4	Fluxo salivar, pH e capacidade tampão	49
4.2.5	Teste de atividade da amilase salivar.....	49
4.2.6	Análise estatística dos parâmetros clínicos (cárie, condição periodontal, higiene) e salivares (fluxo salivar, capacidade tampão, amilase e pH) do grupo controle e Moebius	50
4.2.7	Análise proteômica da saliva	50
4.2.7.1	Análise proteômica da saliva por cromatografia de massa	53

4.2.7.2	<i>Análise proteômica da saliva por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) associada à eletroforese em gel de poliacrilamida (native cationic)</i>	54
4.2.7.3	<i>Ensaio imunoenzimático (Elisa)</i>	55
5	Capítulo 1: RESULTADOS	58
5.1	Avaliação da saúde periodontal, índice de cárie e índice de placa	58
5.2	Avaliação do comprometimento motor	61
5.3	Fluxo salivar, pH e capacidade tampão	61
5.4	Atividade da amilase salivar	64
6	Capítulo 1: DISCUSSÃO	66
7	Capítulo 2: RESULTADOS	72
7.1	Cromatografia líquida associada à espectrometria de massa	72
7.1.1	Identificação das proteínas	72
7.1.2	Razão de abundância das proteínas na quantificação relativa da saliva	78
7.2	Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) associada à eletroforese em gel de poliacrilamida (native cationic)	79
7.3	Teste imunoenzimático (Elisa)	86
8	Capítulo 2: DISCUSSÃO	87
9	CONCLUSÕES	93
	REFERÊNCIAS	94
	ANEXOS	114
	APÊNDICES	115

1 INTRODUÇÃO

A Síndrome de Moebius (SM) é uma desordem neuromuscular congênita incomum, caracterizada pela paralisia periférica total ou parcial de alguns nervos cranianos, obrigatoriamente do VI (nervo abducente) e VII (nervo facial) (1), podendo estar associada a anormalidades dos membros, e mais raramente, associada ao comportamento autista, artrogripose e síndrome de Poland (2-4).

A expressividade da SM é variável, mas de modo geral, os indivíduos acometidos são incapazes de mover os músculos envolvidos na mímica facial, o que os confere o aspecto de face em máscara acompanhada de estrabismo convergente. Alterações bucais, descritas na literatura, incluem lábio superior hipoplásico, microstomia, hipoplasia de mandíbula, palato alto e arqueado, língua hipoplásica, alteração de força de mordida, mordida aberta e alta incidência de cárie (3, 5).

Alguns trabalhos reportam alta incidência de cárie nos indivíduos com SM e as hipóteses aventadas, mas não testadas, incluem o comprometimento da auto limpeza bucal resultante da paralisia do nervo facial em associação à ingestão de dieta pastosa e rica em carboidratos (5, 6). Apesar da descrição dessas alterações, a secreção salivar não tem sido uma preocupação dos pesquisadores que estudam a SM. Sabe-se que a força da mordida influencia na capacidade de secreção salivar total estimulada e secreção parotídea, e que quanto menor é a força e o estímulo mastigatórios, menor é a secreção salivar (7, 8).

Considerando que as glândulas salivares são inervadas por alguns dos nervos que podem estar comprometidos na SM, nossa hipótese é a de que pessoas com a SM exibam redução do fluxo e alteração da composição salivar, e que essa alteração pode ter impacto na saúde bucal do indivíduo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A SM é uma condição clínica caracterizada pela paralisia uni ou bilateral, completa ou parcial dos VI e VII nervos cranianos (9, 10). Os indivíduos com SM apresentam ausência ou deficiência de mímica facial, caracterizando a “face em máscara”, além de estrabismo convergente, com graus variados de acometimento (3).

2.1 Histórico da síndrome de Moebius

Dados não oficiais estimavam que aproximadamente 2000 pessoas em todo o mundo vivam com a SM, em 2008 (11). No Brasil, mais de 400 casos foram notificados até 2007 (12).

A primeira descrição desta diplegia facial congênita foi dada por Von Graeefe em 1880, contudo Möbius foi o primeiro a estabelecer a associação entre diplegia facial congênita com outras malformações, em 1888. Para isso, o autor reuniu 43 casos de paralisia facial adquirida e congênita e as separou em sete grupos conforme o acometimento. Um dos grupos apresentava seis casos de paralisia facial associada aos nervos cranianos facial e abducente. O autor associou esse padrão a degeneração e atrofia no núcleo envolvido (13). Devido a essas descrições iniciais realizadas por Möbius, a síndrome leva o seu epônimo, embora sinônimas sejam utilizadas, tais como, diplegia facial congênita, agenesia nuclear, hipoplasia nuclear congênita, paralisia oculofacial congênita, paralisia abducente-facial congênita e sequência de Moebius (3, 14).

Figura 2.1 – Aspectos faciais de indivíduos com SM em repouso (A) e durante movimentação dos músculos faciais (B)

2.2 Critérios de diagnóstico e diagnósticos diferenciais da SM

Clinicamente a SM caracteriza-se por paralisia facial congênita e incapacidade da abdução ocular, totais ou parciais, determinadas por uma malformação do rombencéfalo (9, 10).

A falta de estabelecimento preciso de critérios de diagnóstico dificulta a avaliação clínica de indivíduos com SM. Kumar (3) estabeleceu alguns critérios de diagnóstico: 1- acometimento completo ou incompleto do nervo facial como sendo essencial 2- malformações em membros são frequentes, 3- acometimento de outros nervos cranianos, entre eles o autor destaca a paralisia uni ou bilateral ocular associada ao acometimento do nervo abducente, possível (3). Verzijl (15) avaliaram 37 indivíduos com SM e definiram a síndrome como uma paralisia facial com acometimento ocular abductor. Apesar de frequentes, outras alterações não foram consideradas essenciais para o estabelecimento do diagnóstico de SM (15).

A primeira conferência científica sobre a SM, intitulada “Moebius Syndrome Scientific Conference”, realizada em 2007, nos Estados Unidos, determinou como critérios clínicos mínimos para o diagnóstico da SM, a presença de fraqueza facial não progressiva (uni ou bilateral) associada à limitação de abdução de um ou ambos olhos (16).

Recentemente, a Academia Americana de Oftalmologia propôs critérios para diferenciar as características fenotípicas faciais e oculares de indivíduos com SM. O objetivo foi determinar se esses indivíduos previamente diagnosticados com SM apresentavam os critérios mínimos para o diagnóstico estabelecido pela “Moebius Syndrome Scientific Conference”. Do total de 112 indivíduos, 88 indivíduos apresentavam os critérios mínimos que os classificassem como SM clássica. Os indivíduos excluídos do estudo apresentavam: limitação do movimento de abdução mas movimentos faciais normais (1 indivíduo), 20 apresentavam paralisia facial mas não preenchiam o critério de falta de movimento de abdução, 2 apresentavam oftalmoplegia e 1 apresentava exotropia associada à limitação ocular vertical. Os autores propõem que os critérios necessários para o diagnóstico de SM clássica são a paralisia facial e déficit no movimento de abdução. Eles ainda sugerem a diferenciação entre a SM clássica e atípica. Para isso deve-se observar se há deficiência dos movimentos oculares verticais, associados ou não à exotropia (comum na SM atípica). Nesse contexto, os autores incluíram os indivíduos com oftalmoplegia (2 indivíduos) e exotropia associada à limitação ocular vertical (1) no grupo com SM, mas do tipo atípica (17).

A SM pode ainda apresentar outras características adicionais tais como distúrbios comportamentais, envolvimento de outros nervos cranianos, malformações musculoesqueléticas, problemas motores, perda de audição, entre outras (3, 15, 18). Malformações de músculos e ossos em membros superiores e/ou inferiores estão frequentemente presentes (3, 10). Geralmente, os pacientes com SM não têm comprometimento mental nem evidência de disfunção de atenção e memória, mas alguns podem se encaixar no espectro autista (9, 18-20). A associação com síndrome de Poland (21), artrogripose (15), hidrosiringomielia (22), síndrome de Kallmann (associação de hipogonadismo hipogonadotrófico e anosmia) (23), holoprosencefalia (24) e hipoplasia unilateral do disco óptico e nanismo hipofisário (25) foram observadas em casos esporádicos.

Todas essas apresentações tornam a síndrome SM extremamente variável em relação aos seus aspectos clínicos (26). As alterações encontradas na SM são comuns ao espectro das síndromes de hipogênese oromandibular-membro. A sobreposição desses quadros é problemática porque os relatos dessas síndromes são raros, portanto torna extremamente difícil a determinação dos limites entre síndromes desse grupo. Além da SM, cinco síndromes fazem parte desse grupo e são consideradas, desse modo, importantes no diagnóstico diferencial: síndrome hipoglossia-hipodactilia, síndrome de Hanhart, síndrome de anquilose glossopalatina, síndrome de fusão esplenogonadal - anomalias dos membros e síndrome de Charlie M (27).

Outro importante diagnóstico diferencial para SM é a paralisia facial congênita, a qual apresenta acometimento restrito ao nervo facial, enquanto a SM acomete o desenvolvimento do tronco encefálico (15, 26, 27). Em neonatais, o diagnóstico diferencial inclui a distrofia miotônica (27).

2.3 Achados orofaciais descritos na SM

As alterações craniofaciais são as que causam maior impacto na qualidade de vida das pessoas com a SM, pois têm implicação na fala, na alimentação, além do prejuízo social (9). Ocasionalmente, além do VI e VII, o III (oculomotor), IV (troclear), V (trigêmeo), IX (glossofaríngeo), X (vago), XI (acessório) e XII (hipoglosso) nervos cranianos estão envolvidos, resultando em dificuldade de mastigação, deglutição e diminuição do reflexo de tosse, que pode levar a complicações respiratórias (3, 9, 10, 28).

Características orofaciais relatadas são a falta de vedamento labial, micrognatia, palato alto e perda da tonicidade do palato mole (29). Alterações motoras e morfológicas na língua, representadas por dificuldade de protrusão, hipoplasia lingual e paralisias unilaterais têm sido relatadas com frequência (5, 9, 10). Perda de sensibilidade em língua e bochechas também sugere comprometimento parcial da raiz sensorial do nervo trigêmeo, podendo ser uni ou bilateral (9, 10).

A alta incidência de cárie em indivíduos com SM foi descrita por alguns autores e atribuída ao prejuízo da auto limpeza bucal ocasionado pela paralisia dos músculos faciais e a ingestão de alimentos semissólidos ricos em carboidratos (5, 30).

A função motora oral também pode estar alterada pela SM, resultando principalmente em falta de vedamento labial e selamento lingual anterior durante a deglutição. Contudo, em um estudo com 33 indivíduos com SM, conduzido pelo nosso grupo, foi observado que as funções motoras orais em indivíduos as idades de 11 a 20 anos eram mais eficientes quando comparadas aos indivíduos mais jovens. Portanto, apesar da síndrome causar danos neurológicos irreversíveis, esses indivíduos podem recuperar parte da função motora das áreas afetadas. Acredita-se que indivíduos SM tenham adquirido essa habilidade motora oral através do aprendizado que ocorre com avanço da idade, inerente à prática e como um mecanismo de adaptação funcional devido às suas restrições motoras. Os autores descreveram ainda que cerca

de 45% dos indivíduos com SM apresentavam algum grau de envolvimento do nervo trigêmeo (par craniano V) (31).

2.4 Etiopatogenia da SM

Na dependência da teoria que suporta a etiopatogenia da alteração, alguns autores optam pela nomenclatura “síndrome de Moebius” enquanto outros usam o termo “sequência”, por acreditarem que o defeito final decorre de uma cascata de eventos após um trauma embrionário (19).

Towifighi et al. (32) classificaram as alterações neuropatológicas da SM e correlacionaram as com as possíveis causas da síndrome. Para isso, os autores utilizaram um caso de autópsia em uma criança com SM associado a 14 casos de autópsia descritos na literatura. Baseado nos achados neuropatológicos encontrados nas autópsias desses 15 indivíduos com SM, os autores propuseram quatro classificações para a SM de acordo com os achados neuropatológicos encontrados em núcleos do tronco cerebral: grupo I, caracterizado por hipoplasia de núcleos dos nervos cranianos afetados; grupo II, caracterizado por perda neuronal e degeneração neuronal secundária a injúria física do nervo facial, possivelmente causada por malformação do osso temporal ou uso de fórceps durante o parto; grupo III, caracterizado pela diminuição na quantidade de neurônios e alterações reativas, assim como degeneração, necrose focal e calcificações nos núcleos do tronco cerebral devido a insuficiência vascular ou infecção; e grupo IV, caracterizada por alterações de miopatias primárias sem lesões nos tronco cerebral ou nervos cranianos. Os autores concluíram que a SM apresentou etiologias diferentes e, por vezes, desconhecidas, contudo a patologia se correlacionava principalmente com algumas áreas anatômicas como núcleos do tronco cerebral, nervos e músculos .

Apesar de não existir uma etiologia estabelecida para a SM, há duas hipóteses bastante discutidas na literatura. A primeira hipótese descreve que a SM pode ser causada por mal desenvolvimento dos rombômeros envolvendo o núcleo motor que origina as fibras do nervo facial, responsáveis pela musculatura da mímica (15, 33). A segunda, e mais aceita, versa acerca da interrupção do sistema vascular em desenvolvimento e a hipoperfusão fetal, que podem ser resultados de uma isquemia fetal transitória, principalmente das artérias vertebrais (24). O suporte sanguíneo deficiente pode resultar em necrose e calcificação secundária dos núcleos do

tronco cerebral (34). Dentre os fatores ambientais que levariam a alteração no fluxo sanguíneo e que têm sido relacionados com a SM destacam-se as substâncias vasoconstritivas. A exposição a agentes teratogênicos, tais como benzodiazepínicos (35), talidomida (36), cocaína (37), ergotamina (38) e misoprostol (39) têm sido associados à SM.

O uso do misoprostol merece destaque devido ao uso ilícito em nossa sociedade, como a droga abortiva mais utilizada no Brasil (40, 41). O misoprostol (Citotec[®]) é um análogo sintético da prostaglandina E1 que é reconhecidamente eficiente no tratamento de úlceras pépticas. No entanto, sua capacidade de agir no tônus uterino, provocando contrações e sangramentos com expulsão parcial ou total do conteúdo do útero, (42) fez com que essa droga se popularizasse como abortiva, no mercado negro brasileiro. Apesar disso, frequentemente o misoprostol falha na indução do aborto quando utilizado durante o primeiro trimestre, de maneira que até 80% das tentativas são fracassadas (39). A tentativa frustra de aborto através do uso do misoprostol pode levar a instalação de distúrbios no desenvolvimento no feto, dentre eles, a SM (43, 44).

A etiologia da SM permanece especulativa, mas certamente é influenciada por fatores genéticos e ambientais. O preenchimento dos critérios de diagnóstico da SM é extremamente importante quando se estuda a etiopatogenia da síndrome. Sabe-se que mutação homozigótica de HOXB1 está associada a paralisia facial congênita, perda de audição, características dimórficas e, possivelmente, estrabismo. Contudo, esse gene não está associado à abdução ocular limitada, condição essencial para o diagnóstico da SM clássica (45). Web et al. (2012) estudaram 4 indivíduos com mutação HOXB1 e nenhum deles apresentou limitação de abdução ocular. Esse resultado corrobora os achados em ratos *Hoxb1*^{-/-}, que apresentaram as mesmas alterações fenotípicas descritas. Desse modo, sugere-se que essa seja uma entidade distinta da SM, causada por mutação de HOXB1, contudo mais estudos são necessários com a finalidade de se identificar mais indivíduos com essa mutação e determinar melhor o espectro fenotípico da síndrome (45).

Em relação ao campo genético relacionado à SM, muitas regiões cromossômicas foram relacionados à SM, sendo que os locus mais acometidos são 1p22, 3q21-q22 (MBS2), 10q21.3-q22.1 (MBS3), e 13q12.2-13 (MBS1) (33).

Desse modo, o aspecto genético da SM é bastante complexo e múltiplos modos de herança foram relatados. No entanto, mesmo em casos familiares de SM, a genética parece desempenhar parte do papel na patogênese da SM, evidenciado pela taxa de penetrância em diferentes padrões familiares relatados. Mais ainda, a SM tem apresentado associação a múltiplos genes e

cromossomos descritos na literatura. Tal fato favorece uma heterogeneidade genética que resulta em diferentes anomalias de gravidade variável (33).

Embora a maioria dos casos reportados na literatura sejam casos esporádicos, a ocorrência familiar existe e se apresenta de maneiras diversas, desde a autossômica recessiva à autossômica dominante e ligada ao X (46).

Apesar do acometimento do nervo facial pela SM, responsável pela inervação das glândulas submandibulares e sublinguais, a relação da SM com as características salivares e bucais nunca foi explorada.

2.5 Saliva

O fluído das glândulas salivares é seromucoso, ligeiramente ácido, proveniente da secreção das glândulas salivares. A saliva total é composta por fluídos secretados pelas glândulas salivares, fluído crevicular e contém ainda debris de alimentos e substâncias produzidas por microrganismos orais (47).

As principais funções da saliva são a lubrificação e proteção dos tecidos bucais, capacidade tampão, clearance bucal, manutenção da integridade dos dentes, capacidade antimicrobiana e exerce ainda um papel essencial na digestão e palatibilidade dos alimentos ingeridos (47).

2.5.1 Secreção salivar

A maioria dos componentes salivares como água, proteínas e íons são secretados pelas glândulas salivares, mais especificamente, grande parte dos componentes proteicos é secretada pelas unidades secretórias acinares (48).

O fluxo salivar possui uma grande variabilidade entre indivíduos. A saliva não estimulada apresenta fluxo de aproximadamente 0,5 ml/min na maioria das pessoas adultas (49, 50). O fluxo salivar sofre influência do ciclo circadiano, onde apresenta maior fluxo durante a tarde quando comparado ao período da manhã (51).

Proporcionalmente, as glândulas salivares participam de maneira distinta na produção e secreção salivar. Durante o fluxo de saliva não estimulada, a parótida contribui com 20% da secreção salivar, a submandibular com 65%, a sublingual com 7 a 8% e as glândulas menores com menos de 10%. Durante a secreção de saliva estimulada, ocorre uma alteração em relação a produção salivar de cada glândula, sendo que a parótida passa a ser a principal participante contribuindo com mais de 50% da secreção salivar (52).

Algumas glândulas possuem a capacidade inerente de secretar saliva, como as glândulas salivares menores. Embora essas glândulas sejam inervadas e aumentem a secreção em resposta ao estímulo nervoso, elas podem ainda secretar saliva em baixa quantidade, mesmo quando não são submetidas à estímulos exógenos como durante o período da noite (48).

A secreção da saliva pode ser estimulada e ela varia de acordo com a natureza do estímulo. O ato de comer proporciona grande estímulo à produção de saliva devido a estimulação de muitos receptores sensoriais como os gustatórios, os mecanorreceptores, os nociceptores e os olfatórios (48). Mesmo entre os estímulos gustativos (salgado, doce, azedo e amargo) há diferença na excitação dos núcleos salivatórios, sendo que o azedo é o mais efetivo (53).

Outro estímulo é a mastigação que, através da movimentação lateral dos dentes, causa a estimulação de mecanorreceptores localizados na região de ligamento periodontal. Além disso, há também a estimulação de mecanorreceptores localizados no tecido gengival. Outro importante tipo de receptores são os olfatórios localizados na lamina crivosa que são estimulados por moléculas voláteis (48).

Inicialmente acreditava-se que a ação de nervos era a única responsável pela secreção salivar, contudo alguns estudos mostram conexão entre alguns hormônios, como a progesterona e a secreção salivar (54-56).

As glândulas salivares são compostas por dois tipos celulares: os ácinos e os ductos. Os ácinos são responsáveis pela produção de saliva e os ductos pela modificação e distribuição salivar (50). Os ácinos são especializados de acordo com a glândula salivar que compõem. As glândulas parótidas contêm principalmente ácinos serosos, as submandibulares são caracteristicamente glândulas seromucosas (10% das células são mucosas e 90% serosas) e as glândulas sublinguais e menores são glândulas principalmente mucosas (48). Os lóbulos acinares estão unidos aos segmentos ductais, que exercem diferentes funções baseadas na localização dessas células e em seu tamanho. Há diferentes tipos de células ductais como

secretoras, mucinosas e ciliadas. Essa heterogeneidade celular é encontrada em todos os segmentos do ducto salivar (57).

As células acinares são responsáveis pela secreção de fluido e da maioria das proteínas, já os ductos contribuem de uma maneira menor para a produção de proteínas. Basicamente, a produção de fluido salivar ocorre a partir da secreção de um fluido isotônico rico em NaCl pelas células acinares serosas, semelhante ao plasma (57). Devido força osmótica exercida pela presença de NaCl intraluminal, ocorre o transporte de grande volume de água pelas passagens transcelulares e paracelulares. A composição iônica desse fluido é modificada durante sua passagem pelo sistema ductal, onde ocorre a secreção de HCO_3^- e K^+ em níveis inferiores em que ocorre a absorção de Cl^- e Na^+ (48). Desse modo é formada a saliva secundária, hipotônica, que serve como veículo para transporte de macromoléculas para fora das glândulas salivares. Com a secreção de HCO_3^- , ocorre a neutralização de ácido, o que propicia um ambiente com pH ótimo que facilita esse transporte de macromoléculas (57).

A secreção de proteínas salivares ocorre de duas maneiras. A primeira é a secreção constitutiva que está relacionada à liberação de proteínas assim que são sintetizadas nas vesículas do complexo de Golgi. Esse processo é responsável pela secreção contínua de muitas proteínas, independentemente de estímulos externos, contudo é influenciado pela atividade nervosa. Outro processo responsável pela secreção de proteínas é a secreção granular, que é o tipo de secreção regulada. Inicialmente, as proteínas são armazenadas em grânulos após sua síntese. Devido a alguns estímulos, os grânulos esvaziam seus conteúdos proteicos para dentro do lúmen ductal. Devido a esses dois mecanismos diferentes de secreção de proteínas para a formação de saliva, pode-se notar variações na composição salivar (48).

2.5.2 Inervação das glândulas salivares

As glândulas submandibulares e sublinguais apresentam a mesma inervação. Ambas glândulas recebem inervação autônoma (simpática e parassimpática) através do nervo corda do tímpano, ramo do nervo facial (VII nervo craniano). A inervação sensitiva dessas glândulas é feita pelo nervo lingual, do ramo mandibular do nervo trigêmeo (V nervo craniano). Nas glândulas parótidas, tipicamente, ocorre inervação sensitiva através do nervo auriculotemporal do ramo mandibular (V nervo craniano). A inervação autônoma (simpática e parassimpática)

provém de ramos do nervo timpânico, cuja origem é o nervo glossofaríngeo (IX nervo craniano) (58).

As glândulas salivares são inervadas pelo sistema nervoso autônomo, através de inervação simpática e parassimpática. Porém, ao contrário do que se observa em outros lugares do corpo, as funções simpáticas e parassimpáticas não funcionam de maneira antagônica, mas sim de maneira complementar culminando na secreção de saliva (59). De modo geral, impulsos provenientes da estimulação parassimpática estimulam alto fluxo salivar com baixa concentração proteica, diferentemente da estimulação simpática que está associada a um fluxo salivar menor com aumento da concentração de proteína da saliva (60-62). Contudo, nem sempre esse processo é uma regra, como na importância de estímulos parassimpáticos para a secreção de mucina (63). As glândulas (mais especificamente células acinares, mioepiteliais e ductais) recebem grande suprimento de nervos parassimpáticos, contudo, a intensidade de inervação simpática difere, em relação a sua intensidade, entre as glândulas salivares (48).

O centro salivatório parassimpático é localizado no bulbo raquidiano e são divididos em núcleos superiores, inferiores e em uma zona intermediária. O núcleo superior é responsável pela conexão do nervo facial com as glândulas sublinguais e submandibulares. O núcleo inferior conecta o nervo glossofaríngeo às glândulas parótidas. A zona intermediária proporciona conexões tanto com as glândulas submandibulares quanto com as parótidas. O controle da liberação de saliva depende de impulsos nervosos reflexos. O centro salivatório simpático localiza-se nos segmentos torácicos superiores da medula espinhal. Os centros superiores do cérebro podem exercer tanto influências inibitórias quanto excitatórias nos centros salivatórios (64, 65).

Estímulos aferentes, como aqueles provenientes de receptores gustativos e mecanorreceptores, vão para centros salivatórios localizados no tronco cerebral. O estímulo da via aferente é processado nos centros salivatórios que, por sua vez, são influenciados pelos centros superiores (64). O impulso eferente é passado para as glândulas salivares através de nervos parassimpáticos e simpáticos que emergem dos centros salivatórios. Os nervos eferentes parassimpáticos conduzem estímulos para as glândulas salivares através de gânglios parassimpáticos localizados próximo à glândula alvo. Sabe-se muito pouco sobre as conexões entre os centros salivatórios e outros núcleos e seu funcionamento não é bem entendido (66).

Em relação à inervação pré-ganglionar eferente da glândula parótida, alguns estudos sugerem que ela não receba apenas impulsos de fibras do nervo glossofaríngeo, mas também de fibras do nervo facial. Mais ainda, acredita-se que o nervo facial que atravessa o parênquima

da glândula parótida, através de suas ramificações, forneça inervação colinérgica às células secretoras glandulares, participando da secreção salivar (48).

De modo geral, a acetilcolina é o transmissor pós-ganglionar parassimpático e a adrenalina o transmissor pós-ganglionar simpático. A adrenalina age nos receptores adrenérgico α_1 e β_1 , enquanto a acetilcolina estimula receptores muscarínicos M1 e M3. A inervação parassimpática das glândulas salivares utiliza ainda outros mecanismos de transmissão, além do colinérgico, tais como peptídeos (substância P, neurocinina A, entre outros). Esses mecanismos parassimpáticos auxiliares evocam efeitos secretórios e potencializam as respostas causadas pela acetilcolina (67).

Os dois tipos mecanismos de inervação autonômica, simpática e parassimpática, estão envolvidos no processo de síntese proteica pelas glândulas salivares. O estímulo parassimpático parece ser bastante importante para o processo de secreção de mucina (50). Além disso, os receptores muscarínicos M1, M3 causam aumento de Ca^{+2} intracelular, que está associado à abertura da membrana apical e dos canais de potássio e cloreto da membrana basolateral das células acinares, levando a secreção de água e eletrólitos (48, 68).

Os estímulos simpáticos, através da atuação em receptores adrenérgicos, principalmente β , atuam na via intracelular do monofosfato cíclico de adenosina, sendo responsáveis pela fusão dos grânulos secretórios com a membrana apical das células glandulares (50).

2.5.3 Propriedades e componentes da saliva

A saliva desempenha um papel importante na manutenção das condições fisiológicas normais dos tecidos da boca, exercendo diversas funções, tais como, mineralização, capacidade de tamponamento, homeostase microbiana, participação no processo gustativo, participação na digestão, reparo tecidual, lubrificação e clearance (69).

O pH salivar normal varia de 6 a 7, portanto, a saliva é ligeiramente ácida. Contudo, o pH salivar pode variar com a alteração do fluxo salivar, passando a apresentar pH de 5.3 (durante baixo fluxo salivar), a 7,8 (durante aumento do fluxo salivar) (70). A hipofunção das glândulas salivares se caracteriza quando o fluxo é menor que 0,16 ml/min (71). O fluxo salivar varia muito, sendo que, para saliva total não estimulada é considerado normal o fluxo que varia de 0,3ml/min a 0,5 ml/min, enquanto a saliva estimulada apresenta fluxo de 1,5ml/min (49, 72).

Para uma análise individualizada, para clínicos que visem monitorar pacientes que apresentem redução no fluxo salivar, estabelece-se uma taxa de fluxo base e, se houver redução de 50% no fluxo salivar deve ser considerado hipofunção das glândulas salivares (73).

A saliva influencia no estabelecimento da integridade dos dentes, através do processo de desmineralização e remineralização. Ocorre um dinamismo entre o processo de desmineralização e remineralização, onde esses processos se intercalam. Se houver tempo adequado entre os desafios acidogênicos é possível que ocorra a remineralização, dessa forma haverá tempo suficiente para que os efeitos advindos da desmineralização possam ser revertidos (74).

Um exemplo desse balanço entre desmineralização e remineralização é o processo de formação de lesões de cárie, que se inicia com a disponibilidade de sacarose às bactérias acidogênicas presentes na placa dental. Com isso, ocorre uma redução rápida de pH, de 7,0 para 5,0 na região de contato entre a superfície do dente e a placa dental, bem como dentro do fluido que compõe essa placa. O pH crítico para a dissolução do esmalte é de aproximadamente 5,5. A placa dental apresenta saturação de cálcio e fosfato, porém, o rápido aumento de íons hidrogênio resulta na sua difusão para dentro do fluido adjacente aos cristais de hidroxiapatita na superfície do esmalte. O aumento de hidrogênio nesses espaços resulta na saída de cálcio e fosfato da superfície do esmalte para a placa dental que recobre a superfície de esmalte, causando desmineralização. Esse egresso de cálcio e fosfato da superfície dental ocorre devido a maior concentração de cálcio e fosfato solúveis na placa dental em comparação com a concentração da superfície do esmalte. Determinada quantidade de cálcio e fosfato sofrem precipitação na superfície de esmalte afetada pelo processo de cárie, devido à alta concentração de cálcio e fosfato na película e placa dental. Esse processo auxilia na manutenção da superfície do esmalte. Após esse desafio cariogênico, ocorre o restabelecimento de pH na placa dental, o que permite o início do processo de remineralização (74).

A presença de cálcio e fosfato, bem como um pH neutro ou mesmo básico, é essencial para o estabelecimento da remineralização (75). Cálcio, fosfato e algumas proteínas salivares atuam de maneira sinérgica, modulando o processo de desmineralização e remineralização (70).

A saliva é supersaturada de cálcio em relação à hidroxiapatita, o que previne a dissolução dentária quando ocorre exposição dos dentes aos fluidos orais, comida e ácidos provenientes da dieta (76-78). O cálcio não ionizado pode ser encontrado na saliva ligado às proteínas salivares, como estaterina. A estaterina permite a manutenção de supersaturação de

cálcio e fosfato na saliva impedindo tanto a precipitação espontânea de fosfato de cálcio e a formação de cristais, prevenindo a formação de cálculo (75, 79, 80).

Outra função importante da saliva é capacidade tampão, que constitui um mecanismo de correção das mudanças de pH ocorridas com a formação de íons ácidos e básicos, provenientes, por exemplo, da fermentação dos açúcares. A alteração do fluxo salivar e, conseqüentemente, dos componentes salivares, influencia diretamente na realização dessa função. Há três sistemas maiores que contribuem para a capacidade tampão inerente à saliva, eles são: o sistema bicarbonato, o sistema fosfato e o sistema de proteínas. A atividade de cada um desses sistemas é relacionada à taxa de saliva produzida, ou seja, ao fluxo salivar (81, 82).

O sistema tampão bicarbonato é considerado o principal responsável pela capacidade tampão da saliva estimulada. Sua concentração é bastante variável, sendo desde 5mmol/l para saliva não estimulada (com fluxo aproximado de 0,3 ml/min) a 24mmol/l na saliva estimulada (com fluxo aproximado de 2ml/min). Além disso, esse sistema apresenta sua máxima efetividade em pH de 6,1 (83). A concentração de HCO_3^- na saliva é determinada pela estimulação da saliva e por proteínas reguladoras do fluído epitelial e de secreção de HCO_3^- , dentre elas destacam-se as anidrases carbônicas. Foi demonstrado que um inibidor de anidrase carbônica, o acetazolamida, inibe significativamente o fluído salivar e a secreção de HCO_3^- (57).

Com aumento da taxa de fluxo de saliva, ocorre maior produção de HCO_3^- como um subproduto do metabolismo da célula. Esse HCO_3^- se difunde na placa dentária e auxilia na neutralização de ácidos produzidos por microrganismos orais. Com aumento na concentração de HCO_3^- , ocorre maior remoção de H^+ produzido por bactérias, ocorrendo desse modo produção de ácido carbônico (H_2CO_3). Contudo, a concentração de H_2CO_3 é mantida em níveis constantes, não havendo aumento da concentração salivar. Desse modo, o ácido carbônico é removido e CO_2 é produzido através da ação da anidrase carbônica, que promove a conversão rápida de H_2CO_3 em CO_2 e água. Uma vez que essa reação ocorre no interior da boca, que é um sistema aberto, e que a pressão parcial de CO_2 na saliva é maior que da atmosfera, ocorre difusão da saliva para o ambiente externo (83).

Com a redução da concentração de H_2CO_3 , a partir da ação da anidrase carbônica, mais íons de hidrogênio (H^+) se ligam ao bicarbonato (HCO_3^-) para formar ácido carbônico (H_2CO_3), restabelecendo o equilíbrio. Dessa forma, o sistema bicarbonato é capaz de neutralizar e remover o excesso de H^+ , como, por exemplo, aqueles produzidos por microrganismos (81).

Durante baixo fluxo de saliva não estimulada essa capacidade tampão é quase ineficaz e é exercida principalmente pelo sistema fosfato (70). Em pH fisiológico da saliva, a maioria

do fosfato é encontrado na forma dihidrogenada (H_2PO^-) ou monohidrogenada (HOP_4^{2-}). O sistema fosfato também é influenciado pelo fluxo salivar, sendo que além da redução na concentração de fosfato com aumento do fluxo, também ocorre variação na forma de fosfato disponível na saliva. Na saliva estimulada, devido ao maior pH, a maioria é encontrada na forma hidrogenada e na saliva não estimulada na forma dihidrogenada. Com aumento do fluxo salivar, a concentração de fosfato reduz e, associada à ela, ocorre a redução da capacidade desse sistema (81).

O sistema tampão de proteínas é menos efetivo do que os sistemas bicarbonato e fosfato. A saliva total contém inúmeras proteínas com funções biológicas específicas. Além das suas propriedades específicas, muitas dessas proteínas ainda possuem a capacidade de agirem como tamponantes, contudo, elas apenas exercem essa função quando o pH está abaixo ou acima de seus pontos isoelétricos, que geralmente, encontra-se dentro da faixa do pH fisiológico (83).

A saliva apresenta ainda propriedades antimicrobianas, associadas às proteínas imunológicas e não imunológicas. A imunoglobulina A, seguida pela imunoglobulina G, são os principais componentes imunológicos da saliva. A imunoglobulina A sofre transporte ativo através das células ductais e acinares utilizando, para isso, uma proteína transportadora chamada receptor de imunoglobulina polimérica. Nas glândulas, a imunoglobulina A é produzida por células plasmáticas e se liga ao receptor de imunoglobulina polimérica localizado na superfície basolateral de células acinares e ductais. Uma vez no interior das células, ela é transportada em vesícula para a membrana apical, onde o receptor de membrana sofre clivagem e libera a imunoglobulina. Embora o processo de transporte ativo de imunoglobulina A possa ser super-regulado pela atividade neural, as células não armazenam essa proteína. Desse modo, mesmo que as células plasmáticas produzam a mesma quantidade de outras imunoglobulinas (como G ou M), a imunoglobulina A se liga preferencialmente ao receptor de imunoglobulina polimérica, o que resulta na sua maior abundância na saliva quando comparada às outras imunoglobulinas (84-86).

A imunoglobulina é uma das primeiras linhas de defesa antimicrobiana e age inicialmente inativando os microrganismos através da ligação e aglutinação dos mesmos, impedindo sua adesão à mucosa oral. Desse modo, esses microrganismos, bem como suas toxinas, são mais facilmente eliminados (87). A imunoglobulina A é reativa contra várias bactérias encontradas na boca, mas mesmo assim o papel da resposta imune no estabelecimento da microbiota residente ainda não é completamente entendido. A microbiota residente persiste na cavidade oral mesmo na presença de anticorpos (88-90).

As proteínas não imunológicas encontradas na saliva, tais como lisozima, histatinas, estaterina, cistatina, também apresentam propriedades antimicrobianas e serão descritas detalhadamente abaixo.

2.5.4 Proteínas salivares

A saliva total contém uma grande quantidade de proteínas e peptídeos, os quais apresentam funções biológicas específicas. Além disso, composição proteica referente à saliva não estimulada é diferente quando comparada à saliva total estimulada e/ou parotídea (70). Essas proteínas exercem funções particulares, como atividade antimicrobiana, importância na formação da película adquirida, papel na modulação de biofilme, participação no processo de desmineralização, entre outras funções (87).

A α -amilase é uma proteína muito abundante na saliva, sendo que a glândula parótida e as glândulas palatinas menores secretam saliva com maiores concentrações dessa proteína (91). Sua função mais conhecida é digestão de algumas macromoléculas, como amido e glicogênio, devido a sua capacidade de catalisar a hidrólise de ligações α -1,4- glicosídicas (87).

Apesar do seu importante papel na digestão, a α -amilase apresenta como função secundária a interação com algumas bactérias e com a superfície do dente (92). Nesse contexto, uma habilidade importante da α -amilase é sua participação na película adquirida, onde ela interage com outras proteínas e apresenta um aumento ao longo da maturação da película adquirida de esmalte (93).

Muitos microrganismos, em especial um grupo referido como “ α -amylase-binding streptococci”, se ligam a essa proteína. Esse grupo é formado por muitas bactérias tais como, *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus cristatus*, *Streptococcus parasanguinis*, *Streptococcus salivarius*, entre outros (92, 94, 95). A α -amilase parece ser um fator importante na colonização desse grupo, uma vez que esses microrganismos foram encontrados apenas em animais que secretam α -amilase salivar (96).

Uma vez que os estreptococos são colonizadores iniciais da cavidade oral e favorecem a colonização do biofilme por outras espécies (97), a α -amilase pode ter uma função importante na colonização desses microrganismos (92).

A α -amilase apresenta ainda outras funções, não estando apenas limitada à adesão de estreptococos à película. Ela participa da adesão entre bactérias, fornece substâncias importantes para a nutrição de estreptococos e outros coabitantes do biofilme, além de ser importante na clearance de bactérias uma vez que interage com algumas dessas bactérias impedido sua adesão à placa dental ou mesmo seu crescimento (98-102).

Nos últimos anos tem sido sugerido o uso da α -amilase como marcador de mudanças relacionadas ao estresse emocional, o que estaria associado à conexão entre essa proteína e o sistema nervoso simpático. A secreção salivar de α -amilase sofre influência do sistema nervoso autônomo, em especial da inervação simpática, através dos mecanismos alfa e beta adrenérgicos. Por conseguinte, é esperado um aumento da secreção de α -amilase salivar durante situações de estresse psicológico, uma vez que esse estresse exige grande ativação do sistema nervoso autônomo (103).

A lisozima é uma pequena proteína, de 145kDA, presente na saliva e também no fluido crevicular. A lisozima possui efeito antimicrobiano que está associado à hidrólise de ligações β -1,4-glicosídicas entre o ácido N-acetilmurâmico e N-acetil-D-glucosamina, ambos encontrados no componente peptidoglicano da parede celular das bactérias. Desse modo, a hidrólise do peptidoglicano resulta em lise celular. A lisozima é mais efetiva contra bactérias gram-positivas, isso ocorre, provavelmente, devido à presença de membrana externa nas bactérias gram-negativas, o que funcionaria como proteção da camada peptidoglicana dessas bactérias. Contudo sua atividade antimicrobiana não se restringe a sua atividade enzimática. Acredita-se que a lisozima exerça propriedade antimicrobiana não enzimática contra bactérias gram-negativas, gram-positivas e fungos (87, 104-106).

Embora a lisozima possua a capacidade de hidrolisar peptidoglicanos, ela pode se ligar ainda aos lipopolissacarídeos, o que causa a mudança na conformação dos mesmos, resultando na redução da atividade imunoestimulatória (107). Os lipopolissacarídeos são componentes da membrana exterior de bactérias Gram-negativas e são considerados fatores de virulência de várias bactérias, contribuindo desde a aderência até a invasão das células hospedeiras (108).

A estaterina é uma proteína que exerce diversas propriedades importantes. A estaterina possui alta afinidade por hidroxiapatita e é um dos precursores na formação da película adquirida de esmalte. A estaterina é bastante susceptível à degradação proteolítica da saliva, porém quando aderida ao esmalte para formação da película adquirida, ela mantém seus níveis constantes desde os estágios iniciais até os finais da formação da película adquirida de esmalte (93). Essa fosfoproteína parece contribuir ainda para a atividade de proteção contra a

desmineralização da película adquirida (109, 110), participa da manutenção do estado de supersaturação de cálcio e fosfato da saliva (75) e auxilia na capacidade de lubrificação da saliva (111). A estaterina atua também no desenvolvimento e modulação de virulência do biofilme, uma vez que inibe a adesão de alguns microrganismos, como *Streptococcus mutans* e promove a adesão de outros como *Actinomyces viscosus* e *Fusobacterium nucleatum* (112-116). Além de participar na modulação do biofilme, a estaterina pode participar do estabelecimento de candidíase. Culturas de *Candida albicans*, na forma de hifa, quando expostas à estaterina, apresentaram aumento na transição de hifa para levedura. Com a deleção de cinco aminoácidos carregados negativamente no sítio N-terminal da estaterina, o efeito que induz a transição para levedura foi aumentado. Esse fato pode ser explicado pela diminuição de forças que se repelem entre aminoácidos carregados negativamente e a superfície carregada negativamente de *Candida albicans*. Uma vez que a forma de hifa de *Candida albicans* é mais invasiva, essa proteína pode desempenhar um papel importante na defesa do hospedeiro contra o estabelecimento da candidíase (117).

As histatinas são um grupo de peptídeos catiônicos ricos em histidina que exercem, dentre outras funções, atividade antibacteriana (112, 118-120), antifúngica (121, 122), participação na formação da película adquirida (93), proteção contra o processo de desmineralização (123) e possível efeito cicatricial (124, 125). Os principais membros desse grupo são as histatinas 1 (com 38 aminoácidos), 3 (com 32 aminoácidos) e 5 (com 24 aminoácidos). A histatina 1 e histatina 3 são produtos dos genes HIS e HIS 2 respectivamente, enquanto a histatina 5 é um produto da clivagem da histatina 3 (126-128).

As histatinas 1 e 3 são mais abundantes durante os estágios iniciais da formação da película adquirida, apresentando uma drástica redução depois de 60 e 120 minutos de formação de película adquirida de esmalte (93). Apesar de serem altamente susceptíveis à degradação proteolítica, a histatina 1 pode sofrer uma diminuição dessa susceptibilidade quando aderida ao esmalte (129).

Dentre as histatinas, a histatina 5 é a que exibe a maior atividade antifúngica tanto contra *Candida albicans*, quanto contra *Cryptococcus neoformans* e *Aspergillus fumigatus*. (130-132). A histatina 5 apresenta uma potente atividade contra *Candida albicans*, incluindo as cepas resistentes aos antifúngicos comumente utilizados (131, 133). Essa capacidade antifúngica da histatina 5 contra *Candida albicans* abrange células planquitônicas, biofilme e, quando adsorvida sobre resina ou hidroxiapatita, impede a adesão da cepa à essas superfícies (121, 134). Adicionalmente, foi demonstrado que a histatina 5 exerce um efeito sinérgico com drogas

antifúngicas, demonstrando o seu potencial para uso em terapia de combinação (135, 136). Acredita-se que a capacidade antifúngica da histatina 5 ocorra, inicialmente, através da sua ligação aos receptores localizados na parede celular fúngica, como Ssa1 e Ssa2, seguida por sua internalização (137). Uma vez no interior da célula fúngica, a histatina 5 induzirá a formação de espécies reativas de oxigênio, danos à mitocôndria e à membrana citoplasmática, efluxo de ATP e íons e morte fúngica (137, 138).

Alguns autores identificaram a família das histatinas como potente agente cicatrizante de feridas, presente na saliva humana, sugerindo até sua utilização como base de um novo medicamento para a cicatrização de feridas de pele. Os autores ressaltaram ainda que as histatinas 1 e 2 são, *in vitro*, as mais potentes na cicatrização de feridas, enquanto que a histatina 5, com notável ação antimicrobiana, é virtualmente ineficaz no processo de reparo. A histatina 3 estimulou a migração de células epiteliais e poderia, portanto, ser um dos principais agentes que medeiam à atividade de cicatrização da saliva humana (124, 125).

As cistatinas são uma família de inibidores de proteases de cisteína com capacidade antibacteriana e participação no controle da mineralização. As cistatinas são encontradas em maior concentração na saliva da glândula submandibular, embora também seja encontrada, em uma concentração muito inferior, na saliva de parótida. Elas são agrupadas em família, sendo que as cistatinas salivares são membros da família 2 e pelo menos 9 isoformas foram descritas, incluindo as cistatinas S, C, SN e AS (139, 140). As cistatinas C e S parecem inibir o crescimento de *Porphyromonas gingivalis*, um agente importante durante o início e a progressão da doença periodontal severa (141). A cistatina AS mostrou atividade antimicrobiana contra *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, contudo essa atividade mostrou-se independente da sua função de inibição de protease. Notou-se ainda uma redução significativa na ligação de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* às células epiteliais bucais (142).

Apesar das cistatinas serem componentes constituintes da saliva, elas são encontradas, especialmente a cistatina C, em níveis aumentados durante a progressão da doença periodontal (143, 144). Há evidências experimentais que apontam que a cistatina C, apesar de não ser a principal constituinte da saliva dentro da família das cistatinas, possui a maior capacidade de inibição de proteases da saliva (145, 146).

As cistatinas participam também da formação da película adquirida, sendo que a cistatina D não apresenta variação de abundância ao longo da formação da película adquirida. Diferentemente, as cistatinas S e AS se encontram aumentadas após 10 e 60 minutos de

formação de película adquirida de esmalte, reduzindo sua abundância após 120 minutos de formação dessa película (93).

As mucinas são glicoproteínas secretadas, na cavidade oral, pelas glândulas submandibulares, sublinguais e pelas glândulas salivares menores (147). As mucinas são as terceiras proteínas mais abundantes na saliva e formam complexos com outras proteínas da saliva (128). As mucinas exercem diversas funções como formação de película nas superfícies da mucosa oral, lubrificação e modulação de microrganismos (128, 147).

Na boca existem, pelo menos, duas grandes populações distintas de mucinas, as ligadas à membrana e as secretadas (148, 149). As mucinas secretadas são muito mais abundantes na boca, e apresentam pelo menos dois subtipos distintos: as de alto peso molecular poliméricas formadoras de gel, com massa molecular aproximada de $2-4 \times 10^4$ kD (MUC5B) e as de baixo peso molecular monoméricas, MUC7, com massa molecular de 130–180 kDa (128, 150, 151).

As mucinas são glicoproteínas altamente glicosiladas sintetizadas e N-glicosiladas no retículo endoplasmático, enquanto que a O-glicosilação ocorre no aparato de Golgi. Após isso, elas são armazenadas em grânulos específicos de células secretoras, que liberam seus conteúdos no lúmen acinar, que através do sistema de ductos alcançam a cavidade oral (152, 153).

As mucinas apresentam elevado teor de oligossacarídeos O-ligados e seus monômeros apresentam variáveis de repetições em série (VNTR) de sequência peptídica no centro da cadeia polipeptídica, ligadas às cadeias de O-glicanos. As VNTR são ricas em serina, treonina, alanina, glicina e resíduos de prolina (128, 154). As mucinas exibem várias cadeias de N-glicanos apesar de ocorrer preponderância de O-glicanos (154).

As mucinas formadoras de gel possuem, geralmente, um tamanho grande e são caracterizadas pela grande quantidade de cadeias de oligossacarídeos. Próximo às extremidades N- e C- terminais das mucinas há cisteínas, que estão envolvidas no processo de polimerização através das pontes de dissulfeto (128, 154).

As mucinas secretadas, como a MUC5B e MUC7, exercem diversas funções como lubrificação, proteção da superfície dos tecidos oral e modulação dos microrganismos orais. MUC5B possui maior capacidade de lubrificação do que MUC7, isso pode ocorrer principalmente devido à sua porção de carboidrato (155).

MUC5B participa da formação da película adquirida de esmalte, principalmente nas camadas sucessivas às camadas iniciais de proteínas que adsorvem à superfície de esmalte. A MUC5B apresentou aumento significativo durante o desenvolvimento, *in vivo*, da película adquirida de esmalte (93). Foi descrita a capacidade da MUC5B de formar complexos proteicos

com outras proteínas, como α -amilase, histatina e estaterina, o que justificaria seu aumento nos estágios finais da formação dessa da película (93, 156).

MUC5B também parece apresentar participação no estabelecimento da microbiota oral, uma vez que a placa dental degrada a cadeia polipeptídica dessa proteína. Contudo essa degradação requer uma atuação sinérgica dos microrganismos que compõe a placa dental, não ocorrendo na presença de microrganismos isolados da placa dental (157, 158).

As mucinas salivares, em especial MUC7, exibem propriedades antimicrobianas. Uma delas é a participação na aglutinação de bactérias, sendo uma das principais proteínas salivares na execução desse papel. Sabe-se que essa proteína apresenta afinidade alta a várias bactérias, como *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus. mitis*, *Streptococcus. Gordonii*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* (159-162). A ligação de MUC 7 às cepas de estreptococos ocorre independentemente da formação de complexos entre MUC7 e outras proteínas salivares.

A capacidade da MUC7 interagir com bactérias tem sido atribuída região N-terminal dessa proteína (163). Mais ainda, a ligação entre *Streptococcus mutans* e MUC7 parece ocorrer através da região N-terminal da mucina e a superfície bacteriana e ser dependente do domínio contendo cisteína, dentro da região N-terminal da MUC7 (164). Peptídeos de MUC7 foram testados contra cepas de *Streptococcus mutan* e exibiram atividade antibacteriana, inibição da formação de biofilme e foram efetivos na redução de biofilme (165). A região N-terminal de MUC7 também parece exibir atividade fungicida semelhante a histatina 5, contra cepa padrão de *Candida albicans* (164).

Indivíduos com doença periodontal associada à *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* apresentaram concentrações reduzidas de MUC7, o que sugere que concentrações baixas dessa proteína possam ter contribuído para o aumento da susceptibilidade desses indivíduos para a doença periodontal (166).

As glândulas salivares, bem como o epitélio da cavidade oral, expressam mucina ligada à membrana MUC1 (167, 168). Após sua secreção, a MUC1 permanece na superfície das células epiteliais orais, agindo como segunda linha de defesa, e participa, possivelmente, na mediação de sinais intracelulares (168, 169). MUC1 parece ser um componente crítico da barreira que protege a mucosa de patógenos. Além disso, acredita-se que esse efeito de proteção da MUC1 pode ser bastante importante na cavidade oral, uma vez que seu epitélio está exposto constantemente a grande quantidade de microrganismos (170). A infecção por *Porphyromonas*

gingivalis ou o aumento de algumas citocinas pro-inflamatórias aumentam a expressão de MUC1 nas células epiteliais de cavidade oral (168).

Tendo em vista a importância da saliva na manutenção da saúde bucal e a escassez de trabalhos científicos sobre o tema, nossa hipótese é a de que pessoas com a síndrome de Moebius exibam alterações quantitativas e qualitativas salivares que os coloca em situação de maior risco para desenvolverem cárie.

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste estudo foi avaliar as características salivares quantitativas e qualitativas, incluindo o proteoma salivar, de indivíduos com SM, associá-las com a saúde bucal, e compará-las com as características salivares de um grupo controle, não afetado pela SM.

Especificamente pretendemos:

- Avaliar o fluxo de saliva total estimulada, não estimulada e parotídeo;
- Avaliar o pH e capacidade tampão da saliva total estimulada;
- Avaliar a atividade da amilase salivar;
- Correlacionar esses resultados com os achados de saúde bucal (índices de cárie, periodontal e de placa);
- Avaliar o proteoma e peptidoma salivar.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Este projeto de pesquisa foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FOUSP. O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foi obtido para todos os sujeitos desta pesquisa (Apêndice A e B).

Foi realizado um estudo caso controle, prospectivo, no qual foram incluídos 30 sujeitos, divididos em dois grupos. O grupo 1 foi composto por 15 indivíduos com a síndrome de Moebius (SM) e o grupo 2 por 15 indivíduos não síndrômicos, pareados quanto ao gênero e idade, que constituíram o grupo controle. Todos os participantes, do grupo 1 e 2, foram avaliados quanto as características faciais, saúde bucal, proteoma e peptidoma salivar, bem como em relação as alterações no fluxo de saliva, atividade de amilase, capacidade tampão e pH da saliva total estimulada.

Foram incluídos indivíduos com SM com diagnóstico prévio dado por geneticistas e atendidos no Centro de Atendimento a Pacientes Especiais (CAPE - FOUSP). Os participantes do grupo controle foram atendidos na Clínica de Adolescentes e na Clínica de Pediatria (FOUSP). Os indivíduos do grupo controle não exibiam paralisia de nenhum músculo facial ou qualquer outra alteração da normalidade, condições estas determinadas para a inclusão do sujeito no grupo controle. Consideramos como critérios de exclusão indivíduos com SM associada à outra doença (hidrocefalia, autismo, etc), indivíduos que não colaboravam com a coleta salivar e indivíduos que fizeram uso de medicações no mês anterior ao da coleta.

Todas as avaliações clínicas foram realizadas no Centro de Atendimento a Pacientes Especiais (CAPE - FOUSP) e na Clínica de Odontopediatria (FOUSP).

4.1 Avaliação clínica

Todos os participantes do grupo de estudo e controle, foram examinados sempre pelo mesmo pesquisador, cirurgião dentista. Avaliamos a higiene bucal pelo índice de placa, a saúde periodontal por meio do Registro Periodontal Simplificado (PSR) e a presença de lesões de cárie, pelo “International Caries Detection and Assessment System” (ICDAS). Avaliamos também todos os participantes em relação à paralisia facial.

4.1.1 Higiene bucal

Para determinarmos a higiene bucal aplicamos o índice de placa de Silness-Löe (171). Para a determinação do índice de placa, cada uma das quatro faces dos dentes (vestibular, lingual, mesial e distal) recebeu uma pontuação 0-3. As pontuações das quatro faces do dente foram somadas e divididas por quatro, a fim de dar o índice de placa para o dente com a seguinte pontuação e critérios:

- 0: Sem placa;
- 1: Placa aderida ao dente e margem gengival que apenas pode ser vista após aplicação de evidenciador de placa;
- 2: Acúmulo moderado de depósitos moles dentro da bolsa gengival ou no dente e margem gengival que pode ser visto a olho nu;
- 3: Acúmulo abundante de matéria mole dentro da bolsa gengival e/ou no dente e margem gengival.

4.1.2 Saúde periodontal

Avaliamos a condição periodontal através do Registro Periodontal Simplificado (PSR). Dez dentes foram sondados com a sonda periodontal, na face vestibular e lingual em 3 regiões distintas (mesial, distal e cervical). A boca foi dividida em sextantes e os terceiros molares não foram analisados. Os dentes utilizados para obtenção desses índices foram 17, 16, 27, 26, 37, 31, 11, 47 e 46. Para determinar a condição periodontal, apesar da análise de dez dentes, apenas 6 anotações foram feitas, uma para cada sextante, utilizando a pior condição encontrada (172). As avaliações seguiam o seguinte critério para o PSR:

- 0: Saúde- A faixa colorida (3,5 a 5,5 mm) da sonda está totalmente visível e não há sangramento à sondagem;
- 1: Gengivite- A faixa colorida da sonda encontra-se totalmente visível, não há presença de cálculos ou margens de restauração mal adaptadas, porém sangramento é percebido à sondagem;
- 2: Gengivite ou periodontite leve- A faixa colorida da sonda encontra-se totalmente

visível, presença de cálculos e/ou margens de restaurações mal adaptadas na região intra-sulcular, podendo ou não ocorrer sangramento à sondagem;

- 3: Periodontite moderada- A parte colorida da sonda está parcialmente intrasulcular;
- 4: Periodontite grave- A faixa colorida da sonda encontra-se totalmente no interior da bolsa;
- Código *- Utilizado para indicar mobilidade dentária, envolvimento de furca, retrações gengivais superiores a 3mm e problemas mucogengivais;

4.1.3 Índice de cárie

Para avaliação do índice de cárie foi utilizado o ICDAS-II (International Caries Detection and Assessment System), que fornece informações sobre lesões não cavitadas de cárie ou lesões iniciais. O ICDAS-II foi designado para diagnosticar seis estágios do processo carioso, desde alterações iniciais na translucidez do esmalte até grandes cavitações, graduando-as de acordo com escores.

Feita a profilaxia e isolamento relativo e sob iluminação artificial, foram avaliadas todas as superfícies dentárias (mesial, distal, vestibular, lingual e oclusal), um quadrante de cada vez, classificando-as de acordo com os seguintes escores:

- 0: Nenhuma alteração na translucidez do esmalte após secagem de 5s;
- 1: Opacidade visível após secagem de 5 segundos;
- 2: Opacidade visível mesmo na presença de umidade;
- 3: Cavidade localizada em esmalte opaco ou pigmentado;
- 4: Sombreamento da dentina subjacente;
- 5: Cavidade em esmalte opaco ou pigmentado com exposição da dentina subjacente;
- 6: Cavitação em esmalte opaco ou pigmentado com exposição da dentina subjacente, envolvendo mais de metade da superfície.

4.1.4 Avaliação das características faciais

A avaliação do comprometimento motor da face de todos os indivíduos do grupo de estudo foi realizada sempre pelo mesmo pesquisador, em cadeira odontológica, sob luz artificial.

Avaliamos a atividade dos nervos II, III, IV, V, VI, VII e XI bilateralmente. Para tanto, solicitávamos que o participante executasse um movimento específico e em seguida executávamos o movimento para que ele compreendesse. A descrição do movimento solicitado para testar cada nervo está descrita no Apêndice C. Conforme a execução do movimento solicitado, o resultado obtido se enquadrava em: nervo totalmente comprometido (score 2), parcialmente comprometido (score 1) ou não comprometido (score 0). Foi obtida então a média em relação ao nervo testado, somando os resultados obtidos por nervo e dividindo pela quantidade de movimentos realizados. Os resultados foram transcritos para uma ficha especialmente desenvolvida para este estudo (Apêndice C).

4.2 Análise quantitativa e qualitativa da saliva

Foram coletadas saliva total não estimulada, saliva total estimulada e saliva parotídea bilateral. As amostras foram coletadas em sala ventilada e iluminada, com os pacientes sentados confortavelmente, no período da manhã, entre 9 e 11 horas, com o objetivo de minimizar o efeito do ritmo circadiano. O paciente foi orientado a abster-se de ingestão de qualquer alimento ou bebida uma hora antes das coletas. A boca foi lavada com água deionizada antes das coletas. A análise da capacidade tampão e pH foram realizados no Laboratório de Bioquímica da Faculdade de Odontologia da USP. A saliva coletada foi estocada em freezer, a -80°C e posteriormente liofilizada a fim de facilitar o transporte para o laboratório da University of Western Ontario (Canadá), onde foi realizada a análise proteômica e peptidômica.

4.2.1 A coleta de saliva total não estimulada

A coleta de saliva total não estimulada permitiu a análise do fluxo, atividade de amilase e do proteoma e peptidoma. O indivíduo foi orientado a cuspir a saliva em tubo estéril mantido em gelo a cada 1 minuto, por 11 minutos, sendo que o primeiro minuto foi descartado (173, 174). A saliva, utilizada para análise proteômica e peptidômica, foi centrifugada ($20,000 \times g$ por 20 minutos a 4°C) (175) e o sobrenadante foi separado em alíquotas de 1 ml e armazenado em freezer -80°C .

4.2.2 A coleta de saliva total estimulada

A coleta de saliva total estimulada permitiu a realização do proteoma e peptidoma, assim como o pH, a capacidade tampão e atividade de amilase. A coleta de saliva total estimulada foi realizada através da mastigação de Parafilm[®] (1 movimento a cada 1 segundo). O indivíduo foi orientado a cuspir a saliva em tubo estéril mantido em gelo a cada 1 minuto e a não engolir. O primeiro minuto de coleta foi descartado e a coleta de saliva estimulada continuou por mais 10 minutos. Ao final, o paciente foi orientado a cuspir a saliva com o Parafilm[®] (176). A saliva, utilizada para análise proteômica e peptidômica, foi centrifugada e o sobrenadante foi separado em alíquotas de 1 ml e armazenado em freezer -80°C .

4.2.3 A coleta de saliva estimulada da parótida

A coleta de saliva estimulada da parótida permitiu a avaliação do fluxo salivar, análise da atividade de amilase, realização do proteoma e peptidoma. A coleta de saliva das glândulas parótidas, direita e esquerda, foi realizada individualmente. A produção salivar foi estimulada pela aplicação de 20 μl de solução de ácido cítrico a 2%, colocadas sobre a porção dorsal da língua, no terço posterior, em intervalos regulares de 30 segundos, em ambos os lados da língua, exatamente por 6 minutos. A saliva relativa ao primeiro minuto foi descartada. A coleta da

saliva foi feita com dispositivo de Carlson-Crittenden modificado (176). O coletor é composto por dois círculos concêntricos de plástico. O ajuste do círculo interno foi feito em cima da abertura do ducto de Stensen, na face da mucosa jugal direita e esquerda, em direção oposta ao primeiro molar superior direito. O portal de saída deste círculo estava conectado por um tubo plástico de centrifuga, com fundo cônico (Tipo Falcon, 15ml) descartável. O círculo exterior foi conectado à mangueira de sucção do sugador, que quando pressionada, criou vácuo, puxando desta forma a mucosa jugal que cerca a abertura do ducto de Stensen, e mantendo o coletor em posição. Esse procedimento foi realizado na abertura do ducto de Stensen localizado na mucosa jugal esquerda e direita (176). Durante a coleta o recipiente de saliva foi mantido em gelo e após a coleta. A amostra foi ineditamente plaqueada em ágar sangue por 48 horas, visando confirmar se não houve contaminação da amostra por saliva total, e o restante foi congelada imediatamente em freezer -80°C.

4.2.4 Fluxo salivar, pH e capacidade tampão.

O fluxo foi obtido a partir do cálculo do volume da amostra pelo tempo de coleta da amostra. Imediatamente após a coleta, foi verificado o pH inicial da saliva com auxílio de pHmetro de bancada (Quimis, São Paulo, Brasi). A capacidade de tamponamento foi realizada por titulação com solução de HCl 0,01 N, imediatamente após a coleta (177). A capacidade de tamponamento e o pH da saliva foram realizados no Laboratório de Bioquímica, da FOUSP.

4.2.5 Teste de atividade da amilase salivar

O ensaio enzimático foi feito para determinar da atividade de α -amilase na saliva para os 6 grupos, a saber: saliva não estimulada, estimulada e parotídea do grupo de estudo e saliva não estimulada, estimulada e parotídea, do grupo controle. A α -amilase metaboliza o substrato, convertendo o amido em maltose. A intensidade da cor desenvolvida é proporcional à atividade de α -amilase na amostra. Os tubos foram incubados por 5 minutos em estufa a 37°C e colocados em água fervendo por 5 minutos. Foi colocado 200 μ l de cada tubo por poço, em triplicata, em

microplaca de 96 poços de polipropileno, e a leitura foi realizada em espectrofotômetro à 560 nm (178). Os reagentes utilizados seguem no Anexo A.

4.2.6 Análise estatística dos parâmetros clínicos (cárie, condição periodontal, higiene) e salivares (fluxo salivar, capacidade tampão, e pH) do grupo controle e Moebius

Foi realizado um estudo caso-controle, com 15 indivíduos com Síndrome de Moebius, comparado com 15 indivíduos de idade similar, sem a síndrome.

A maioria das variáveis coletadas é de ordem contínua e foram descritas por meio de estatísticas de posição (mínimo, máximo, média, mediana) e escala (desvio padrão e intervalo interquartil).

Comparações entre os grupos, ou entre indivíduos com e sem PSR, foram realizadas por testes não paramétricos de Mann-Whitney. E a correlação entre variáveis ordinais e contínuas, como os cortes do ICDAS, o escore do PSR e as variáveis de fluxo, placa e idade, foram avaliadas pelo coeficiente de correlação de Pearson e gráficos de dispersão (179).

Para avaliar os efeitos conjuntos de fluxo e grupo na variação dos cortes do ICDAS, ajustaram-se modelos de regressão beta com interação, utilizando função de ligação logística para a média, uma vez que a distribuição da variável respostas era uma proporção (proporção de lesões sobre o número de dentes), e a suposição de normalidade dos resíduos de uma regressão linear simples não estava satisfeita (180). Para exemplificar os resultados ajustados pelo modelo, construíram-se gráficos com as estimativas de saliva não estimulada variando segundo o fluxo não por grupo e fixando o valor de saliva parotídea esquerda em 0,3 ml/min.

Os testes foram interpretados considerando um nível de significância de 5%. Para as análises utilizou-se o *software* R 3.1.1 (R Core Team) com auxílio do pacote *betareg* (181).

A atividade de amilase salivar foi avaliada através do teste t-Student, comparando o grupo controle com o grupo Moebius.

4.2.7 Análise proteômica da saliva

Inicialmente as amostras foram centrifugadas para remover materiais insolúveis, armazenadas a -80°C e posteriormente liofilizadas. A análise do proteoma e peptidoma salivar foi realizada no laboratório do Prof. Walter Siqueira, na University of Western Ontario, Canadá.

A concentração de proteína total de cada indivíduo, controle e com SM, foi estabelecida através da técnica do ácido bicinconínico (Pierce BCA Protein Assay Kit, Thermo Fisher Pierce, Rockford, IL, USA).

O proteoma foi obtido por duas metodologias distintas, a primeira a partir da cromatografia líquida associada à espectrometria de massas (LTQ-Velos, Thermo Scientific), através de separação de proteínas intactas por cromatografia de alta resolução. A segunda utilizou a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) associada à eletroforese em gel de poliacrilamida (native cationic).

Uma vez que o proteoma pode sofrer influência do fluxo salivar, as amostras dos diferentes tipos de saliva, de ambos os grupos, foram agrupadas de acordo com o fluxo em ml por min. Desta forma, para cada grupo, estudo e controle, os 4 tipos de saliva (estimulada, não estimulada, parotídea esquerda, parotídea direita) foram subdivididos de acordo com baixo fluxo (abaixo da média do grupo ou alto fluxo (acima da média do grupo)). Foram excluídos: 1- Um indivíduo com SM que apresentou as amostras de saliva estimulada e não estimulada com quantidade de proteínas totais menor que 30µg/ml; 2- Indivíduos que apresentaram ausência de saliva durante a coleta de saliva total não estimulada (1 indivíduo) e parotídea esquerda e direita (7 sujeitos cada). Esta divisão resultou em 16 grupos descritos no Quadro 4.1:

Indivíduos avaliados	Tipo da saliva (média do fluxo salivar do grupo)	Grupos de acordo com o fluxo (número de indivíduos inseridos no grupo)	Sigla
Indivíduos com SM	Saliva total não estimulada (0,17 ml/min)	Acima do fluxo do grupo (5 indivíduos)	G1
		Abaixo do fluxo do grupo (8 indivíduos)	G2
	Saliva total estimulada (0,45 ml/min)	Acima do fluxo do grupo (6 indivíduos)	G3

continua

conclusão

Indivíduos avaliados	Tipo da saliva (média do fluxo salivar do grupo)	Grupos de acordo com o fluxo (número de indivíduos inseridos no grupo)	Sigla
	Saliva parótida direita (0,15 ml/min)	Abaixo do fluxo do grupo (8 indivíduos)	G4
		Acima do fluxo do grupo (2 indivíduos)	G5
		Abaixo do fluxo do grupo (5 indivíduos)	G6
	Saliva parótida esquerda (0,14 ml/min)	Acima do fluxo do grupo (3 indivíduos)	G7
		Abaixo do fluxo do grupo (4 indivíduos)	G8
	Saliva total não estimulada (0,68 ml/min)	Acima do fluxo do grupo (7 indivíduos)	G9
		Abaixo do fluxo do grupo (8 indivíduos)	G10
	Saliva total estimulada (1,19 ml/min)	Acima do fluxo do grupo (9 indivíduos)	G11
		Abaixo do fluxo do grupo (6 indivíduos)	G12
Indivíduos controle	Saliva parótida direita (0,32 ml/min)	Acima do fluxo do grupo (6 indivíduos)	G13
		Abaixo do fluxo do grupo (9 indivíduos)	G14
	Saliva parótida esquerda (0,33 ml/min)	Acima do fluxo do grupo (6 indivíduos)	G15
		Abaixo do fluxo do grupo (9 indivíduos)	G16

Quadro 4.1 - Divisões das amostras em 16 grupos de acordo com o fluxo e condição (Síndrome de Moebius ou controle) dos indivíduos

4.2.7.1 Análise proteômica da saliva por cromatografia líquida associada à espectrometria de massa

Foi realizado um pool com quantidades iguais de proteínas de cada paciente para que totalizasse 10µg para cada grupo estudado (G1-G16). Em seguida, as amostras foram secas com a auxílio do evaporador rotacional (Vacufuge™, Eppendorf AG, Barkhausenweg, HH, DEU) por 2 horas. Foi adicionado, 50 µL da solução 1 (4M urea+10mM DTT (dithiothreitol)+50mM NH₄HCO₃ com pH=7,8) e incubado por 1 hora a temperatura ambiente. A digestão foi realizada adicionando-se 150 µL de solução 2 (50mM NH₄HCO₃ com pH=7,8) e 5% em peso de tripsina (Promega, Madison, WI, USA). A purificação e dessalinização dos peptídeos resultantes da digestão e preparo das amostras para espectrometria de massas foram feitas com auxílio de microcolunas de fase reversa (ZipTip® Pipette Tips Millipore (Millipore, Billerica, MA, USA)).

A separação dos peptídeos e análises espectrométricas foram realizadas nas amostras dos 16 grupos (G1 a G16) utilizando nano- HPLC Proxeon LTQ Velos (Thermo Scientific, San Jose, CA, EUA), que permite cromatografia líquida in-line com a coluna capilar de 75mm X 610cm (Pico Tip™ EMITTER, New Objective Woburn, MA) preenchida com resina C18 com poros de 5 µm de diâmetro e 200 Å (Michrom BioResources, Auburn, CA), acoplado ao espectrômetro de massas (LTQ-Velos, Thermo Scientific, San Jose, CA, EUA) usando ionização por electrospray em modo de busca, na faixa de valores m/z 390-2000 em associada à MS/MS. Para isso 10µg de amostra referente aos grupos (G1-G16) foram ressuspensas em 20µl (0,5µg/µl) de ácido fórmico a 0,1% então submetidas a nLC-ESI-MS/MS. O HPLC de fase reversa nanoflow foi desenvolvido com gradiente linear de 85 minutos variando de 0 a 100 % de solvente B (ácido fórmico 0,1% em acetonitrila), em fluxo de 200 nL/min, com pressão máxima de 280 bar (182).

Os dados de MS/MS foram confrontados com o banco de dados de proteínas humanas (UniProt e TrEMBL, Swiss Institute of Bioinformatics, Geneva, Switzerland, <http://ca.expasy.org/sprot>) usando o algoritmo SEQUEST no software Proteome Discoverer 1.3 (Thermo Scientific, San Jose, CA, USA). Os filtros utilizados no SEQUEST como critério aplicado aos espectros MS/MS foram: 1.5; 2.5; 3.1; 3.1; 4.5 para o Xcorr aplicado em adição ao filtro Percolator. Os resultados das buscas foram filtrados a uma taxa de falsas descobertas de 1% utilizando uma estratégia de pesquisa de banco de dados inversa.

Para análise proteômica quantitativa, três arquivos a partir dos dados –MS de cada grupo foram analisados usando o software SIEVE (Versão 2.0 Thermo Scientific, San Jose, CA, EUA). O fluxo de trabalho experimental do SIEVE foi definido como controle de comparação para as análises, onde uma classe de amostras é comparada com uma ou mais diferentes classes de amostras. Neste estudo, as seguintes amostras foram comparadas: G1 X G9, G2 X G10, G3 X G11, G5 X G13, G6 X G14, G7 X G15, G8 X G16, G1 X G2, G3 X G4, G5 X G6, G7 X G8, G11 X G12, G13 X G14.

Para a etapa de alinhamento, um único arquivo MS pertencente ao grupo padrão para essa comparação foi selecionado como o arquivo de referência e todos os outros processos foram ajustados para gerar a melhor correlação a este. Após o alinhamento, os processos de detecção e integração (ou framing) foram realizados utilizando o nível de dados MS com um recurso denominado "quadros de MS2 Scans". Com este tipo de enquadramento (framing), somente os valores MS com razão massa-carga (m/z) associados às análises MS2 foram utilizados. Quaisquer medições de m/z que não estivessem presentes em MS2 foram ignoradas. O software gerou então os quadros (frames), e a partir da integração foram feitas as análises estatísticas para cada quadro. Em seguida as sequências de peptídeos obtidas a partir da pesquisa de banco de dados usando o Algoritmo SEQUEST no Proteome Discoverer 1.3 foram importadas para o SIEVE. O filtro Percolator foi aplicada às sequências peptídicas durante a importação, eliminando todas as sequências com q-value maiores que 1% (taxa de falsa detecção). Os peptídeos foram agrupados em proteínas e então foi calculada a relação de proteínas e o valor de p. A abundância relativa de uma proteína individual foi considerada significativamente diferente quando os valores observados foram, 0,75 para diminuição e 1,25 para aumento de abundância. Além disso, foi considerado o valor de $p < 0.05$, como descrito (182) .

4.2.7.2 *Análise proteômica da saliva por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) associada à eletroforese em gel de poliacrilamida (native cationic)*

Foi realizada ainda a separação proteica através da separação baseada na diferença de peso molecular, utilizando a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil

sulfato de sódio (SDS-PAGE) a 12% (182). Para esse ensaio foram utilizadas 35 µg por grupo ressuspendidas em 15 µl de tampão de amostra de SDS (0.125 M Tris-HCl, 4% SDS, 2% de glicerol, 10% 2 mercaptoetanol). Para controle foi utilizado 5 µl do padrão Precision Plus Protein™ All Blue Standards (10-250 kD) (Bio-Rad Laboratories Ltd., Mississauga, ON, Canada). Os géis foram corados com 0.2% Coomassie Brilliant Blue em 40% de metanol, 10% de ácido acético para o volume final de 1litro. A descoloração foi feita em 40% de metanol, 10% de ácido acético e 50% de água. Os resultados foram analisados em Image Lab™ software (Bio-Rad). Após isso, as bandas evidenciadas por SDS-PAGE foram retiradas do gel, descoloridas, tratadas com acetonitrile, digeridas (com solução de tripsina a 1µg/0,1ml) e purificadas em microcolunas de fase reversa (ZipTip® Pipette Tips Millipore) e então submetidas à nLC-ESI-MS/MS.

A análise quantitativa de histatinas (1, 3 e 5) foi realizada por eletroforese em gel de poliacrilamida (native cationic) (183). Proteínas catiônicas migram do ânodo para o cátodo durante a eletroforese. Para isso, 25 µg de proteínas dos grupos referentes à saliva parotídea (G5-G8, G13-G16) foram dissolvidas em tampão de amostra (4g de sacarose, 4mg de Methyl Green para volume final de 10 ml). Os géis de empilhamento e de separação foram polimerizados sob incidência de luz (120 volts e 60 volts respectivamente) por 2 horas cada. Como controle foram utilizados 2µg de cada histatina (1, 3 e 5). Os géis foram corados com 0.1% Coomassie Brilliant Blue em 8% de metanol, 7% de ácido acético para o volume final de 1litro. A descoloração foi feita em 40% de metanol, 10% de ácido acético e 50% de água. Os resultados foram analisados em Image Lab™ software (Bio-Rad).

4.2.7.3 Ensaio imunoenzimático (Elisa)

A quantificação da concentração de amilase salivar foi realizada nos 16 grupos. Portanto, como antígeno para sensibilização da microplaca foi utilizada a amilase (178). As amostras dos 16 grupos (100 µL) e os padrões foram adicionadas à placa de 96 poços e incubados por 1 hora a 37°C. Em seguida, a microplaca foi lavada 3 vezes com 250 µL de solução salina tamponada (250 µL Tris Buffered Saline -TBS) por poço. Após a lavagem, foram adicionados 200 µL de TBST contendo 3% de BSA em cada poço, com a finalidade de bloquear os sítios não cobertos e a placa foi incubada a 4°C overnight. A placa foi então lavada três vezes

com TBST (250 μ L por poço).

O anticorpo primário para amilase utilizado foi o anti-alfa amilase (diluição 1:1000, PA 1- 29115, Pierce Biotechnology, IL, USA) diluído em TBST contando 1% de BSA que foi incubado (100 μ L por poço) por 1 hora a 37°C. A placa foi lavada com três vezes com TBST e então o anticorpo secundário horse radish peroxidase ligado ao anti-rabbit IgG (diluição de 1:5000 em TBST contando 1% de BSA, Rockland, PA, USA) foi adicionado a placa (100 μ L por poço) e incubado a temperatura ambiente por 1 hora, em um ambiente escuro. Após duas lavagens com TBST e uma com TBS, foi adicionado o OPD (o-phenyldiamine dihydrochloride, Sigma-Aldrich, MO, USA) e incubado por 30 minutos a temperatura ambiente em local escuro. Após a incubação foi adicionado H₂SO₄ a 10% (50 μ L por poço) e o produto foi analisado em espectrofotômetro ajustado ao comprimento de onda de 490nm. Para a curva padrão foram utilizadas as seguintes concentrações de amilase: 1 μ g/mL, 0.75 μ g/mL, 0.5 μ g/mL, 0.25 μ g/mL, 0.1 μ g/mL. O experimento foi realizado em triplicata.

Capítulo 1

5 Resultados referentes à:

- 5.1 Avaliação da saúde periodontal, índice de cárie e índice de placa
- 5.2 Avaliação das características faciais
- 5.3 Fluxo salivar, pH e capacidade tampão.
- 5.4 Atividade da amilase salivar

6 Discussão

5 RESULTADOS

Dos 15 indivíduos com SM, 7 eram do gênero feminino (46,7%) e 8 eram do gênero masculino (53,3%). Dos 15 indivíduos do grupo controle, 6 eram do gênero feminino (40%) e 9 do gênero masculino (60%) (Tabela 5.1).

Tabela 5.1- Dados demográficos dos participantes do estudo

Grupos	Gênero		Etnia		Idade	
	masculino	feminino	branco	negro	média	mediana
Grupo SM	8 (53,3%)	7 (46,7%)	12 (80%)	3 (20%)	13,23	14
Grupo controle	9 (60%)	6 (40%)	13 (86,67%)	2 (13,33%)	13,43	13,81

O grupo formado por indivíduos com SM apresentava faixa etária entre 4 e 21, com média de idade de 13,23 e mediana de 14. O grupo controle apresentava idade entre 10 e 19, com média de 13,43 e mediana de 13,81 (Tabela 5.1).

5.1 Avaliação da saúde periodontal, índice de cárie e índice de placa

Em relação a saúde periodontal, a maioria dos indivíduos com SM apresentou gengivite, enquanto que a maior parte dos pacientes do grupo controle apresentou boa saúde periodontal. O grupo Moebius apresentou escores superiores de PSR quando comparado ao grupo controle.

Dentre os 15 participantes afetados pela SM, 4 apresentaram os índices PSR iguais a 0 (zero), que indica boa saúde periodontal; 6 indivíduos apresentaram PSR igual a 1 (sangramento a sondagem); 2 indivíduos apresentaram PSR igual a 2 (gengivite ou periodontite leve); e 3 indivíduos apresentaram PSR igual a 3 (periodontite moderada). No grupo controle, 9 indivíduos apresentaram PSR igual a 0 (zero), isto é, boa saúde periodontal; 5 indivíduos apresentaram PSR igual a 1; apenas 1 indivíduo apresentou PSR igual a 2; e nenhum paciente

apresentou PSR igual a 3. O grupo SM apresentou média de PSR superior ($p < 0,05$) ao do grupo controle (Tabela 5.2).

Dos 15 indivíduos com SM avaliados, 9 apresentaram índice de placa inferior a 1, representando pouco acúmulo de placa; e 6 pacientes apresentaram índice de placa entre 1 e 2, representando um moderado acúmulo de placa. Em relação ao grupo controle, dos 15 indivíduos avaliados, 10 indivíduos apresentaram índice de placa entre 0 e 1 (pouco acúmulo de placa) e 5 indivíduos apresentaram índice de placa entre 1 e 2 (acúmulo moderado de placa). A média do índice de placa do grupo de Moebius foi 0,99, e maior que a do grupo controle, que foi de 0,75, contudo não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos (Tabela 5.2 e Apêndice D).

Tabela 5.2 – Médias do fluxo da saliva total não estimulada (NE), total estimulada (ES) e das glândulas parótidas direita (PD) e esquerda (PE), pH inicial, capacidade tampão da saliva ES, e índices de doença periodontal (PSR), placa e ICDAS de indivíduos do grupo Mebius e controle

Análise	Controle			Mebius			Valor p*
	N	Média	Desvio padrão	N	Média	Desvio padrão	
Idade	15	13,43	2,65	15	13,23	5,59	0,922
PSR	15	0,47	0,64	15	1,27	1,1	0,033
Placa	15	0,75	0,44	15	0,99	0,57	0,191
NE (ml/min)	15	0,68	0,34	15	0,17	0,13	<0,001
ES (ml/min)	15	1,19	0,5	15	0,45	0,28	<0,001
PD (ml/min)	15	0,32	0,23	13	0,15	0,22	0,01
PE (ml/min)	15	0,33	0,17	13	0,14	0,16	0,01
pH inicial ES	15	7,43	0,19	13	7,39	0,21	0,779
pH 7,0 (ul/ml)	15	471,33	340,94	13	466,67	250,25	0,751
6,9-6,0	15	1150,67	928,79	13	643,08	239,49	0,013
5,9-5,0	15	493,33	338,69	13	239,23	52,99	<0,001
4,9-4,0	15	325,33	294,71	13	265,38	82,83	0,595
ICDAS - Corte 1	14	0,24	0,21	13	0,47	0,38	0,126
ICDAS - Corte 2	14	0,19	0,16	13	0,49	0,35	0,012
ICDAS - Corte 3	14	0,07	0,07	13	0,11	0,12	0,292
ICDAS - Corte 4	14	0,02	0,03	13	0,05	0,06	0,056
ICDAS - Corte 5	14	0,01	0,01	13	0,04	0,06	0,108

(*) Teste de Mann-Whitney

Em relação ao índice de cárie, a ocorrência das lesões de cárie foi mais alta entre os participantes com SM em todos os limiares. O ICDAS apresentou valores superiores no grupo Moebius, sendo significativa ao nível de 5% apenas no Corte 2, porém, como mostra o Apêndice E, a correlação entre os cortes do ICDAS é moderada para alta. O que indica que essa relação pode ser importante em todos os cortes (Apêndice E).

5.2 Avaliação do comprometimento motor

Os pares de nervos avaliados foram agrupados por indivíduo, conforme os nervos afetados (VII, VI, IV, III, II, XII, V, XI) e o grau de acometimento. Os resultados demonstram a ampla variabilidade de acometimento pela síndrome, e denota que não há um padrão bilateral de acometimento (Apêndice F).

5.3 Fluxo salivar, pH e capacidade tampão

Indivíduos com SM apresentaram fluxo de saliva não estimulada (NE), saliva estimulada (ES), saliva da parótida direita (PD) e saliva da parótida esquerda (PE) menor em relação ao grupo controle.

A média referente ao pH inicial da saliva estimulada do grupo Moebius foi semelhante ao do grupo controle, como mostra a Tabela 5.2.

A capacidade tampão da saliva estimulada foi analisada de acordo com a quantidade de ácido (solução de HCL a 0,01N) adicionado à saliva durante os seguintes intervalos de pH: pH inicial – pH 7,0; pH 6,9 – pH 6,0; pH 5,9 – pH 5,0; pH 4,9 – pH 4,0. A capacidade tampão da saliva estimulada dos indivíduos com Moebius foi menor em todas as faixas de pH analisadas, em relação aos controles. Na faixa entre pH 6,9 – 6,0, a quantidade de ácido adicionado foi maior para os dois grupos estudados (Moebius e controle). As faixas de pH entre 6,9 – 6,0 e 5,9 – 5,0 apresentaram maior resistência ao ácido no grupo controle quando comparado ao grupo Moebius. Esta diferença foi estatisticamente significativa ($P < 0,05$) (Tabela 5.2).

Foi realizada a correlação entre os índices clínicos como índice periodontal (PSR), índice de cárie (ICDAS) com o índice de placa e com os achados salivares como fluxo salivar, capacidade tampão e pH. O PSR não exibiu correlação com nenhum aspecto avaliado, como fluxo salivar (saliva não estimulada, estimulada e parotídea bilateral), placa, pH e capacidade tampão.

A Tabela 5.3 aponta correlações de Pearson entre os cortes do ICDAS e as variáveis coletadas. Nota-se correlação entre medidas de fluxo (saliva não estimulada e saliva parotídea) e ICDAS de indivíduos com SM (Tabela 5.3).

Tabela 5.3 - Correlação entre achados clínicos como índice de cárie ICDAS (Cortes 1 a 5) com aspectos salivares

Variável	Proporção sobre o número de dentes				
	Corte 1	Corte 2	Corte 3	Corte 4	Corte 5
Idade	-0,336	-0,121	-0,241	-0,122	-0,275
PLACA	0,188	0,324	0,046	-0,027	0,092
NE (ml/min)	-0,43*	-0,451*	-0,286	-0,415*	-0,498*
ES (ml/min)	-0,306	-0,366	-0,265	-0,201	-0,087
PD (ml/min)	-0,164	-0,268	-0,367	-0,274	-0,233
PE (ml/min)	-0,214	-0,423*	-0,414*	-0,502*	-0,415*
pH inicial ES	-0,083	0,056	-0,043	0,096	-0,003
pH 7,0 (ul)	0,104	0,087	0,057	0,091	-0,091
6,9-6,0	-0,276	-0,463*	-0,281	-0,31	-0,215
5,9-5,0	-0,55*	-0,717*	-0,52*	-0,474*	-0,513*
4,9-4,0	-0,338	-0,224	-0,29	-0,26	-0,246

(*) valor $p < 0,05$ para testar nulidade do coeficiente

Em relação a regressão beta realizada para analisarmos a influência da saliva não estimulada no ICDAS, quando comparados indivíduos com um baixo fluxo de saliva não estimulada, o ICDAS dos indivíduos com SM tende a ser superior ao do controle. Porém, se o fluxo do paciente com a síndrome for ligeiramente superior (em relação a outros pacientes com síndrome), em torno de 0,2, a 0,3 ml/min o seu ICDAS tende a ser similar ao do indivíduo controle. O fluxo não está associado ao ICDAS no grupo controle (Figuras 5.1 e 5.2 e Apêndice G e H).

Figura 5.1 - Valores preditos para o Corte 1 do ICDAS segundo NE (ml/min) e Grupo, fixando PE em 0,3 ml/min

Figura 5.2 - Valores preditos para o Corte 2 do ICDAS segundo NE (ml/min) e Grupo, fixando PE em 0,3 ml/min

Notou-se correlação entre fluxo de saliva não estimulada em todos os cortes de ICDAS, com exceção do 3. Essa correlação associa o baixo fluxo salivar ao alto índice de cárie. O fluxo de saliva parotídea esquerda mostrou correlação com todos os cortes de ICDAS com exceção do corte 1. A capacidade tampão, na faixa entre 6,9 – 6,0 mostrou correlação com o corte 2. A faixa entre 5,9 – 5,0 mostrou correlação com todos os cortes do ICDAS (Tabela 5.3). Ou seja, a capacidade tampão reduzida dos indivíduos com SM apresenta relação com o índice de cárie.

Foi realizada ainda a análise relacionando o fluxo de parótida direita e parótida esquerda segundo o lado da paralisia do caso. Testou-se esses valores segundo os lados da paralisia pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis com valores de p respectivos 0,307 e 0,921. Desse modo, não houve correlação entre o lado acometido pela síndrome e o fluxo parotídeo referente a esse lado.

5.4 Atividade da amilase salivar

A saliva não estimulada e a saliva estimulada apresentaram atividade de amilase salivar significativamente maior ($P < 0,05$) em indivíduos com SM quando comparada ao grupo de indivíduos sem a síndrome. Não houve diferença estatisticamente significativa para a saliva parotídea entre o grupo controle e o grupo de SM (Figura 5.3).

Figura 5.3 - Atividade da enzima amilase salivar (U/mg) para indivíduos do grupo de SM e controle (* $p < 0,05$)

7 DISCUSSÃO

Nossos resultados confirmaram a nossa hipótese de que pessoas com a SM têm mais lesões de cáries e que este grupo também exhibe fluxo salivar diminuído, capacidade tampão prejudicada e alteração em sua composição, quando comparada ao grupo controle. Além disso os participantes com a SM exibiram maiores índices de doença periodontal e cárie, embora não tenha sido observada diferença no índice de placa.

Acreditamos que a diminuição do fluxo de saliva não estimulada que constatamos nos indivíduos com SM, esteja relacionada com o envolvimento do nervo facial (VII), uma vez que ele é responsável pela inervação parassimpática das glândulas submandibular e sublingual (184). Nenhum autor, dentro do nosso conhecimento, havia, até o momento apontada essa característica da SM.

Mais ainda, sabe-se que a manutenção da população progenitora de células indiferenciadas é essencial para o desenvolvimento de órgãos, tais como as glândulas salivares submandibulares. Um recente estudo demonstrou que a inervação parassimpática mantém essas células em estado indiferenciado, o que é essencial para a organogênese. Desse modo, uma vez que indivíduos com SM apresentam provável deficiência de inervação parassimpática das glândulas submandibulares e sublinguais, devido ao acometimento do nervo facial pela SM, eles podem exibir alteração no desenvolvimento dessas glândulas (185, 186). Nesse aspecto, estudos de imagem seriam importantes para avaliarem o grau de desenvolvimento morfológico das glândulas salivares de indivíduos com SM.

Segundo Navazesh et al. (71), fluxo de saliva não estimulada que varie entre a faixa de 0,12 a 0,16 ml/min pode ser considerado hipofunção das glândulas salivares. Nossos resultados mostraram média do fluxo salivar de indivíduos com SM de 0,169 ml/min, e 9 indivíduos com fluxo inferior a 0,16 ml/min. O fluxo salivar diminuído, como o fluxo salivar estimulado variando 0,8-1,0 ml / min, é considerada uma condição patológica e tem sido um forte indicador de um risco aumentado para cárie (187). Nos indivíduos com SM a média de fluxo de saliva estimulada encontrada foi muito inferior (0,452 ml/min), sendo que em todos os indivíduos avaliados o maior fluxo foi de 0,9 ml/min. Uma vez que os indivíduos que participaram do presente estudo não tinham nenhuma outra alteração concomitante com a SM, tal como espectro autista ou déficit mental, a diminuição significativa no fluxo salivar pode ser um dos fatores que

justificariam a maior incidência de cárie apesar da higienização adequada realizada pelos mesmos, representada pela ausência de diferença estatística entre os índices de biofilme.

Em relação a cárie, o baixo fluxo salivar apresenta maior embasamento científico do que a diminuição da capacidade tampão (187). Alguns estudos realizados com indivíduos classificados como “cárie ativos” e “livres de cárie” demonstraram redução da capacidade tampão em indivíduos cárie ativos (188, 189). Contudo, não está bem estabelecido a influência da atividade da capacidade tampão no processo de estabelecimento de cárie, uma vez que a literatura apresenta resultados contraditórios (190-192).

Em nosso estudo, os indivíduos SM expressaram uma redução na capacidade tampão na faixa entre 6,9-6,0, e na faixa de 5,9-5,0. Na faixa de pH de 6,9-6,0 foi necessário adicionar mais ácido para a redução do pH para ambos os grupos. Este fato pode ser explicado pelo tipo de sistema tampão envolvido neste processo na saliva estimulada. A capacidade tampão da saliva estimulada é regulada principalmente pelo sistema de bicarbonato e da saliva não estimulada pelo sistema fosfato, os quais apresentam valor de pK em torno do pH 6,1 e 6,8, respectivamente (177). Portanto, os indivíduos com SM podem apresentar redução na função do sistema tampão bicarbonato. O fluxo salivar parece estar associado à capacidade tampão, sendo que qualquer fator responsável pela diminuição no fluxo salivar tende a diminuir também a capacidade tampão da saliva (49, 191). No nosso estudo, os indivíduos com SM apresentaram tanto o fluxo de saliva estimulada reduzido, quanto diminuição da capacidade tampão dessa saliva. E houve relação entre essa diminuição e maior frequência de lesões de cárie.

No nosso estudo não houve correlação entre a condição periodontal encontrada em indivíduos com SM e a diminuição da capacidade tampão ou a diminuição dos fluxos salivares. Todavia, é realmente difícil estabelecer uma conexão precisa entre esses parâmetros devido ao fator etiológico complexo da doença periodontal que envolve vários níveis, como o microbiano, o hospedeiro, o status de saúde e fatores ambientais. Não está estabelecido o papel da capacidade tampão e sua influência da progressão periodontal, uma vez que há resultados muito contraditórios na literatura (193-196). Nesse contexto torna-se necessária a realização de estudos clínicos longitudinais avaliando a relação da capacidade tampão e o fluxo salivar com os parâmetros da doença periodontal como perda de osso e formação de cálculo.

Todos os fluxos salivares avaliados (saliva estimulada, não estimulada e parotídea bilateral) estavam reduzidos no grupo Moebius, quando comparados ao grupo controle (Tabela 5.2). Os estudos recentes têm correlacionado composição salivar e formação de película

adquirida com um aumento da susceptibilidade para o desenvolvimento de cárie em indivíduos saudáveis (197, 198).

Nossos resultados demonstraram o aumento na atividade da amilase salivar em indivíduos com SM, quando comparados aos controles, para a saliva estimulada e não estimulada. É importante salientar que a quantidade dessa enzima não pode ser diretamente relacionada à sua atividade, portanto, um aumento na sua capacidade não significa necessariamente um aumento na sua quantidade.

Streptococcus mutans desempenha um papel fundamental na modulação da transição de forma não-patogênica para a forma altamente cariogênica do biofilme. Na cavidade bucal, há interação de componentes bacterianos e salivares com carboidratos nos biofilmes aderidos sobre a superfície do dente. A alfa amilase possui a capacidade de digerir amido em maltose, maltodextrinas e outros oligossacarídeos. Portanto, ocorre maior disponibilidade de suprimentos para algumas bactérias entre elas, *Streptococcus mutans*. Há evidências que demonstram que a interação da sacarose e amido com alfa amilase e glicosiltransferases de estreptococos podem modular o desenvolvimento de biofilme modificando tanto sua estrutura quanto seu metabolismo. Essas interações podem ainda aumentar a patogenicidade do *Streptococcus mutans* dentro do biofilme (199, 200). Desse modo, todas essas alterações poderiam contribuir para aumentar o risco para o estabelecimento de lesões de cárie nos indivíduos com SM. Contudo mais estudos são necessários a fim de avaliar essa hipótese, como por exemplo, avaliação microbiológica do biofilme desses indivíduos.

Em relação ao acometimento facial pela SM Rucker et al. (201) caracterizaram o perfil de deficiência em relação movimentos oculares e faciais de 40 indivíduos com SM. Desses, 37 apresentaram fraqueza facial em ambos os lados e 3 apresentaram em apenas um dos lados. Todos os 15 participantes de nosso estudo, com a SM, apresentaram fraqueza facial bilateral. Contudo, o acometimento facial encontrado não era simétrico, sendo que em 13 indivíduos, havia predomínio da paralisia em um dos lados da face.

Uma possível explicação para a diminuição da atividade parotídea em pessoas com a SM seria a possível influência da corda do tímpano, ramo no nervo facial, na inervação da glândula parótida (202, 203). Apesar desse fato ser inconclusivo devido a achados contraditórios na literatura, alguns estudos sugerem que não apenas fibras do nervo glossofaríngeo influenciem o fluxo parotídeo, mas também fibras do nervo facial (nervo corda do tímpano) (202). Diamant et al. (202) estudaram vinte e dois casos com o objetivo de estudar a relação entre a corda do tímpano e a capacidade secretora da glândula parótida. Em 13 casos,

a corda do tímpano havia sido danificada e a maioria dos afetados apresentou redução de até 50% na secreção parótida durante estimulação gustativa. De 6 indivíduos com paralisia facial periférica, 4 deles manifestavam envolvimento da corda do tímpano, e, nestes casos, também a secreção parótida foi reduzida. De maneira interessante, os pesquisadores observaram que um indivíduo com paralisia do nervo glossofaríngeo unilateral envolvendo o nervo timpânico, mas a função da corda do tímpano intacto, exibiu uma resposta parotídea secretora satisfatória à estimulação gustativa, embora o principal nervo secretor da glândula parótida estivesse paralisado. Contudo deve-se ressaltar que mais estudos devem ser feitos visando estudar o papel da corda do tímpano na secreção de saliva parotídea e sua relação fisiológica com essa glândula.

Keur et al., (204), estudou a relação entre fluxo de parótida em indivíduos com paralisia de Bell. Os autores relataram que não houve diferença no fluxo parotídeo entre esses indivíduos e os controles. Também não houve diferença entre o lado afetado pela paralisia e o lado considerado saudável. Nossos resultados demonstraram que não houve correlação entre o lado afetado e o fluxo parotídeo, contudo, indivíduos com SM apresentaram fluxo parotídeo reduzido. Tal achado pode ser explicado devido ao acometimento congênito de múltiplos nervos cranianos pela síndrome de Moebius, diferentemente da paralisia de Bell, que acomete apenas o nervo facial tardiamente (205). Outro fator que pode estar relacionado, contudo não há pesquisas acerca do assunto, é a influência da SM e dos nervos que podem ser acometidos pela síndrome na formação e desenvolvimento das glândulas salivares desses indivíduos.

Nossos resultados sugerem que as alterações salivares encontradas em indivíduos com SM, como redução do fluxo salivar e baixa capacidade de tamponamento, podem estar relacionadas com alguns achados clínicos desses indivíduos, como maior frequência de lesões de cárie. Assim, nossos resultados podem fornecer informações adicionais importantes sobre maior susceptibilidade de cárie em indivíduo com SM. Estes achados clínicos, associados à capacidade tampão e fluxos reduzidos reforçam a importância do acompanhamento e uso de métodos motivacionais e de prevenção de cárie e doença periodontal entre esses pacientes.

A aplicabilidade dos resultados está diretamente relacionada com os procedimentos clínicos que devem ser adotadas durante o planejamento do tratamento odontológico de portadores de SM. Os dentistas devem estar cientes de que esses pacientes têm muitas características inerentes da síndrome que favorecem o estabelecimento de lesões de cáries e o desenvolvimento de doença periodontal. Algumas destas características foram evidenciadas pelo nosso estudo, tais como baixo fluxo salivar e capacidade tampão modificado. Portanto, a identificação de lesões de mancha branca incipientes não deve ser subestimada e deve receber

a atenção imediata de um dentista. Além de diagnosticá-las, o dentista deve tratá-las prontamente e utilizar estratégias preventivas com base na característica de reversibilidade da lesão.

Capítulo 2

7 Resultados referentes à análise proteômica:

7.1 Cromatografia líquida associada à espectrometria de massa

7.1.1 Identificação das proteínas

7.1.2 Razão de abundância de proteínas na quantificação relativa da saliva

7.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) associada à eletroforese em gel de poliacrilamida (native cationic)

7.3 Teste imunoenzimático (Elisa)

8 Discussão

7 RESULTADOS

Os resultados foram organizados conforme a técnica proteômica utilizada.

7.1 Cromatografia líquida associada à espectrometria de massa

Para a realização da metodologia cromatografia líquida associada à espectrometria de massa dois passos foram empregados: a identificação das proteínas e a razão de abundância de proteínas na quantificação relativa da saliva

7.1.1 Identificação das proteínas

Primeiramente foram comparadas as amostras de indivíduos com SM e controles em relação à saliva não estimulada, para ambos os parâmetros, acima e abaixo do fluxo salivar do grupo. Desse modo, 4 grupos de saliva não estimulada estavam inclusos: SM acima do fluxo salivar (G1), SM abaixo do fluxo salivar (G2), controles acima do fluxo salivar (G9) salivar e controles abaixo do fluxo salivar (G10). Foram encontradas um total de 1246 proteínas, sendo que 89 eram exclusivas do G1, 325 encontravam-se apenas no G2, 187 apenas no G9 e 441 apenas no G10. Os quatro grupos apresentaram 29 proteínas semelhantes, tais como α -amilase, anidrase carbônica, albumina, mucina-19, mucina 5B, cistatina S, cistatina SN, mucina 5 C, entre outras. Foram encontradas 16 proteínas comuns aos grupos G1 e G2, 8 proteínas comuns aos grupos G1 e G9, 13 aos grupos G1 e G10, 24 proteínas aos grupos G2 e G9, 49 proteínas aos grupos G2 e G10 e 26 proteínas comuns aos grupos G9 e G10. Para os grupos G1, G2 e G9, foram encontradas 5 proteínas comuns a todos esses grupos. Quando analisados os grupos G1, G2 e G10, eles apresentavam 9 proteínas semelhantes (Figura 7.1).

Figura 7.1 - Diagrama de Venn mostrando a relação do número de proteínas identificadas em cada grupo e suas interrelações; G1- Saliva não estimulada de SM (fluxo acima); G2- Saliva não estimulada de SM (fluxo abaixo); G9- Saliva não estimulada dos controles (fluxo acima), G10- Saliva não estimulada dos controles (fluxo abaixo)

Para a análise da saliva estimulada, foram utilizadas amostras de indivíduos com SM e do grupo controle, para ambos os parâmetros, acima e abaixo da média de fluxo do grupo. Assim, 4 grupos de saliva estimulada foram incluídos: SM acima do fluxo salivar (G3), SM abaixo do fluxo salivar (G4), controles acima do fluxo salivar (G11) salivar e controles abaixo do fluxo salivar (G12). Um total de 833 proteínas foram encontradas, sendo que 298 eram exclusivas do G3, 193 do G4, 153 do G11 e 53 encontravam-se apenas no G12. Os quatro grupos apresentaram 16 proteínas em comum, tais como α -amilase, albumina, anidrase carbônica, mucina 5B, cistatina S, cistatina SN, cistatina B, entre outras. Foram encontradas 19 proteínas comuns aos grupos G3 e G4 (como mucina 17), 27 comuns aos grupos G3 e G11, 17 comuns aos grupos G4 e G11, 8 aos grupos G11 e G12, 13 aos grupos G3 e G12 e 6 aos grupos G4 e G12. Para os grupos G3, G4 e G11 foram encontradas 11 proteínas em comum e 10 proteínas em comum para os grupos G3, G11 e G12. Para os grupos G4, G11 e G12 foram encontradas 2 proteínas em todos os grupos. Para os grupos G3, G4 e G12 foram encontradas 7 proteínas em comum nesses grupos (Figura 7.2).

Figura 7.2 - Diagrama de Venn mostrando a relação do número de proteínas identificadas em cada grupo e suas interações; G3- Saliva estimulada de SM (fluxo acima); G4- Saliva estimulada de SM (fluxo abaixo); G11- Saliva estimulada dos controles (fluxo acima), G12- Saliva estimulada dos controles (fluxo abaixo)

A análise proteica também foi realizada nas amostras de saliva proveniente da parótida direita, tanto para indivíduos com SM quanto para controles, respeitando os parâmetros relativos ao fluxo salivar do grupo. Desse modo, 4 grupos referentes a saliva de parótida direita foram avaliados: indivíduos com SM acima do fluxo salivar (G5), indivíduos com SM abaixo do fluxo salivar (G6), controles acima do fluxo salivar (G13), controles abaixo do fluxo salivar (G14). Um total de 1008 proteínas foram observadas, sendo que 11 encontravam-se apenas no grupo G5, 28 apenas no G6 (entre elas a cistatina C), 315 exclusivas do G13 e 536 exclusivas do G14. Os quatro grupos apresentaram 6 proteínas em comum (dentre elas a anidrase carbônica e a α -amilase). Apenas 1 proteína foi comum aos grupos G5 e G6, 1 proteína ao grupo G5 e G13, 3 proteínas comuns aos grupos G5 e G14, 3 proteínas comuns aos grupos G6 e G13, 14 proteínas comuns aos grupos G6 e G14 e 75 proteínas comuns aos grupos G13 e G14. Para os grupos G5, G6 e G14 foram encontradas 2 proteínas em comum e 2 proteínas em comum para os grupos G5, G13 e G14. Para os grupos G6, G13 e G14 foram encontradas 11 proteínas em todos os grupos (Figura 7.3).

Figura 7.3 - Diagrama de Venn mostrando a relação do número de proteínas identificadas em cada grupo e suas interrelações; G5- Saliva parotídea direita de SM (fluxo acima); G6- Saliva parotídea direita de SM (fluxo abaixo); G13- Saliva parotídea direita dos controles (fluxo acima), G14- Saliva parotídea direita dos controles (fluxo abaixo)

Para avaliação da saliva de parótida esquerda, foram analisadas amostras de indivíduos com SM e controles, levando em consideração o fluxo salivar dos mesmos. Desse modo, 4 grupos de saliva parotídea esquerda foram avaliados: indivíduos com SM acima do fluxo salivar (G7), indivíduos com SM abaixo do fluxo salivar (G8), controles acima do fluxo salivar (G15), controles abaixo do fluxo salivar (G16). Foram encontradas um total de 702 proteínas, sendo que 16 eram exclusivas do G7, 95 encontravam-se apenas no G8, 248 apenas no G15 e 235 apenas no G16. Os quatro grupos apresentaram 10 proteínas semelhantes (entre elas a α -amilase e a anidrase carbônica). Foram encontradas 3 proteínas comuns aos grupos G7 e G8, 9 proteínas comuns aos grupos G7 e G15, 5 aos grupos G7 e G16, 10 proteínas aos grupos G8 e G15, 16 proteínas aos grupos G8 e G16 e 34 proteínas comuns aos grupos G15 e G16. Para os grupos G7, G8 e G15, foram encontradas 2 proteínas comuns a todos esses grupos. Quando analisados os grupos G7, G8 e G16, eles apresentavam 2 proteínas semelhantes. Os grupos G7, G15, G16 apresentavam 2 proteínas em comum. Para os grupos G8, G15 e G16, foram encontradas 15 proteínas semelhantes (Figura 7.4).

Figura 7.4 - Diagrama de Venn mostrando a relação do número de proteínas identificadas em cada grupo e suas interrelações; G7- Saliva parotídea esquerda de SM (fluxo acima); G8- Saliva parotídea esquerda de SM (fluxo abaixo); G15- Saliva parotídea esquerda dos controles (fluxo acima), G16- Saliva parotídea esquerda do grupo controle (fluxo abaixo)

Foram também estabelecidas as intersecções entre o grupo composto por saliva não estimulada de indivíduos com SM e o grupo de saliva não estimulada de indivíduos sem SM (controle). Um total de 1.246 proteínas foram encontradas, sendo que 162 estavam em ambos os grupos, 430 foram encontradas apenas nos indivíduos com SM e 654 exclusivas do grupo controle (Figura 7.5 A). Para intersecções entre o grupo composto por saliva estimulada de indivíduos com SM e o grupo de saliva estimulada de indivíduos controle, um total de 833 proteínas foram encontradas. Dessas, 109 eram comuns a ambos os grupos, 510 eram exclusivas da saliva estimulada de indivíduos com SM e 214 eram exclusivas dos controles (Figura 7.5 B). As intersecções entre o grupo composto por saliva parotídea de indivíduos com SM e o grupo de saliva parotídea de indivíduos controle revelaram um total de 1.378 proteínas. Dessas, 125 proteínas eram comuns aos dois grupos, 109 eram exclusivas dos indivíduos com SM e 1.253 dos indivíduos sem síndrome (Figura 7.5 C).

Figura 7.5 - Diagramas de Venn mostrando a relação do número de proteínas identificadas em cada grupo e suas interrelações. A representa a saliva não estimulada, B saliva estimulada e C saliva parotídea.

7.1.2 Razão de abundância das proteínas na quantificação relativa da saliva

A partir da quantidade inicial de proteínas encontradas nas comparações pré-determinadas, foram estabelecidas as proteínas que tiveram uma razão na quantificação relativa entre os grupos comparados. Desse modo, a razão de abundância de cada proteína para cada comparação estudada foi considerada significativa quando o nível de proteína apresentava valor $<0,75$ (para as proteínas menos abundantes e $>1,25$ (para as proteínas mais abundantes). Foram realizados um total de 163 cruzamentos, dos quais 7 foram feitos entre grupo de indivíduos com SM (G1 a G8) e grupo controle (G9-G16). O restante visou avaliar a abundância em relação ao fluxo salivar dentro condição (SM ou Controle). A razão de abundância e as proteínas mais abundantes em cada combinação entre os grupos está descrita na Tabela 7.1. A descrição detalhada e a função das proteínas estão descritas no Apêndice I.

Tabela 7.1- Comparação entre dois grupos onde foi determinado o total de proteínas quantificadas, a quantidade de proteínas que apresentaram razão de abundância. Com base na razão entre os grupos foi determinada a quantidade de proteína mais abundante em cada grupo ($<1,25$ ou $>0,75$)

Razão entre os grupos	Total de proteínas quantificadas	Proteínas com razão de abundancia	Proteínas com razão de abundancia $>0,75$	Proteínas com razão de abundancia $<1,25$
G9/G1	45	14	0	14
G2/G10	109	9	9	0
G3/G11	64	12	2	10
G5/G13	9	1	1	0
G6/G14	33	8	8	0
G7/G15	23	7	3	4
G8/G16	43	3	1	2
G1/G2	59	8	8	0
G3/G4	53	9	0	9
G5/G6	9	2	0	2
G7/G8	17	1	0	1
G12/G11	36	12	11	1
G13/G14	94	18	18	0

7.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) associada à eletroforese em gel de poliacrilamida (native cationic)

O SDS-PAGE é uma técnica bioquímica responsável pela separação de proteínas e peptídeos baseado na diferença de peso molecular. Esta técnica proporciona evidenciar da separação das proteínas e peptídeos através do seu tamanho. Foram feitas 4 comparações para saliva não estimulada (G9XG1, G10XG2, G1XG2, G9XG10) estimulada (G11XG3, G12XG4, G3XG4, G11XG12) e parotídea direita e esquerda (G13XG5, G15XG7, G5XG7, G13xG15, G14XG6 G16XG8, G6XG8, G14XG16). Em todos os casos o primeiro grupo foi considerado como 100%, e comparado ao segundo grupo. No presente estudo foi possível notar diferença na quantidade de algumas bandas quando comparadas as amostras de indivíduos com SM e controle. Nota-se um aumento na intensidade de algumas bandas nos indivíduos com SM, principalmente aquelas relacionadas às proteínas de alto peso molecular. Esse perfil foi observado principalmente na saliva estimulada e não estimulada de indivíduos com SM. As amostras de parótida também mostraram alterações porém não seguiam um padrão. A banda correspondente à amilase não apresentou grande variação entre os grupos analisados. A banda 8, que correspondia à cadeia leve de imunoglobulina, também se mostrava mais intensa na saliva estimulada e não estimulada de indivíduos com SM. A banda 1, que continha mucina 5B, apresentou coloração mais intensas na saliva estimulada e não estimulada de indivíduos com SM (Tabelas 7.2 a 7.5) (Figuras 7.6 a 7.9).

As bandas cortadas dos géis SDS-PAGE que foram submedidas ao nLC-ESI-MS/MS, confirmaram a presença das proteínas de alto peso molecular (Muc 5B), peso molecular médio (amilase), e baixo peso molecular (cistatina) nas amostras estudadas (Figura 7.10).

A eletroforese em gel de poliacrilamida (native cationic) foi realizada com o objetivo de analisar a quantidade de histatinas (1, 3 e 5) na saliva das parótidas esquerda e direita de indivíduos com SM e controle. Comparando grupo controle com grupo SM, para os grupos determinados como acima da média de fluxo salivar (G5, G7, G13 e G15), para ambas as parótidas, nota-se uma tendência a maior abundância de histatina 1, 3 e 5, tanto do lado direito quanto esquerdo, em saliva parotídea de indivíduos com SM. Houve exceção da Histatina-1 (G5XG13) e histatina-3 (G7XG15). Foram também confrontados os grupos controle com grupos SM, para os grupos determinados como abaixo da média de fluxo salivar (G6, G8, G14 e G16). Nota-se que o G6 apresentou menor quantidade das três histatinas quando comparado

ao grupo G14. O oposto foi observado para os grupos G8 e G16, onde os indivíduos com SM (G8) apresentaram maior quantidade de histatinas 1,3 e 5 quando comparados ao controle (G16) (Tabelas 7.6 e 7.7; Figuras 7.11 e 7.12).

Figura 7.6 - Bandas avaliadas através de SDS-PAGE para saliva não estimulada de indivíduos com SM (G1 e G2) e controles (G1 e G9)

Tabela 7.2 - Comparação, em porcentagem, das bandas de saliva não estimulada. O primeiro grupo de cada comparação (grupo em negrito) foi considerado como controle, ou seja, 100%. Desse modo, valores considerados positivos significam que o segundo grupo apresentou maior concentração na banda analisada (B1 a B13)

Bandas	G9 XG1	G10 XG2	G1 XG2	G9 XG10
B1	30,2	27,3	1,3	3,6
B2	15,5	11,0	-3,5	0,5
B3	21,7	8,3	1,9	14,5
B4	25,3	23,3	-2,1	-0,5
B5	-3,9	8,8	2,1	-9,9
B6	24,2	21,3	-9,1	-7,0
B7	29,1	15,3	-9,8	1,1
B8	19,0	8,4	2,2	12,1
B9	1,8	24,7	-1,6	-19,6
B10	13,3	15,7	-11,0	-12,9
B11	9,8	-24,6	-35,0	-5,3
B12	52,1	2,8	-32,4	-0,1
B13	-11,2	-8,6	-22,5	-24,7

Figura 7.7 - Bandas avaliadas através de SDS-PAGE para saliva estimulada de indivíduos com SM (G3 e G4) e controles (G11 e G12)

Tabela 7.3 - Comparação, em porcentagem, das bandas de saliva estimulada. O primeiro grupo de cada comparação (grupo em negrito) foi considerado como controle, ou seja, 100%. Desse modo, valores considerados positivos significam que o segundo grupo apresentou maior concentração na banda analisada (B1 a B14)

Bandas	G11 XG3	G12 XG4	G3XG4	G11XG12
B1	39,5	11,3	-9,1	14,0
B2	24,6	17,1	-4,0	2,1
B3	19,5	4,8	9,1	24,3
B4	30,2	20,1	-1,9	6,4
B5	2,7	-3,7	-6,4	-0,2
B6	19,5	3,2	-9,0	5,4
B7	26,0	7,0	-2,6	14,6
B8	21,4	4,3	-2,7	13,3
B9	-11,1	11,6	1,6	-19,1
B10	4,8	12,0	7,3	0,4
B11	12,0	9,1	-5,5	-3,0
B12	-2,3	-4,7	-0,7	1,7
B13	-16,6	25,6	-1,6	-34,7
B14	-7,9	20,5	2,3	-21,8

Figura 7.8 - Bandas avaliadas através de SDS-PAGE para saliva parotídea esquerda e direita (acima da média de fluxo do grupo) de indivíduos com SM (G5 e G7) e controles (G13 e G15)

Tabela 7.4 - Comparação, em porcentagem, das bandas de saliva parotídea esquerda e direita com fluxo acima da média do grupo. O primeiro grupo de cada comparação (grupo em negrito) foi considerado como controle, ou seja, 100%. Desse modo, valores considerados positivos significam que o segundo grupo apresentou maior concentração na banda analisada (B1 a B14)

Bandas	G13 XG5	G15 XG7	G5 XG7	G13 xG15
B1	-2,5	16,9	30,6	8,9
B2	-0,6	16,2	5,6	4,9
B3	1,4	1,1	-0,5	0,9
B4	45,9	14,5	-27,4	5,9
B5	-13,7	-9,7	9,7	-5,4
B6	9,4	20,1	-5,3	3,6
B7	11,8	-1,8	-3,1	8,3
B8	28,7	3,4	-20,6	2,2
B9	31,4	10,6	-24,4	-0,6
B10	30,8	17,7	-15,0	11,2
B11	15,1	11,8	-20,7	-8,7
B12	26,9	10,1	-34,0	-16,3
B13	61,5	6,3	-22,0	25,9
B14	-9,3	-3,6	14,2	3,6

Figura 7.9 - Bandas avaliadas através de SDS-PAGE para saliva parotídea esquerda e direita (abaixo da média de fluxo do grupo) de indivíduos com SM (G6 e G8) e controles (G14 e G16)

Tabela 7.5 - Comparação, em porcentagem, das bandas de saliva parotídea esquerda e direita com fluxo abaixo da média do grupo. O primeiro grupo de cada comparação (grupo em negrito) foi considerado como controle, ou seja, 100%. Desse modo, valores considerados positivos significam que o segundo grupo apresentou maior concentração na banda analisada (B1 a B14)

Bandas	G14 XG6	G16 XG8	G6 XG8	G14 XG16
B1	13,9	-4,0	-9,1	7,8
B2	10,4	0,9	4,1	14,0
B3	0,0	4,4	2,4	-1,9
B4	-2,2	0,1	-1,1	-3,4
B5	-5,4	14,5	20,3	-0,5
B6	-3,2	2,2	6,4	0,7
B7	-2,3	-6,8	-5,8	-1,2
B8	-5,7	6,9	3,2	-8,9
B9	-8,1	13,6	20,0	-2,9
B10	-6,9	9,8	9,8	-6,9
B11	-1,1	8,3	11,2	1,5
B12	-8,7	36,5	38,5	-7,3
B13	-8,9	32,8	25,8	-13,7
B14	-12,4	-12,6	-1,6	-1,4

Figura 7.10 - SDS-PAGE mostrando identificação das respectivas bandas submedidas ao nLC-ESI-MS/MS

Tabela 7.6 - Quantidade de histatinas 1,3 e 5 (μg) na saliva parótidea dos grupos de Moebius e controle com fluxo salivar acima da média (G5, G13, G7 e G15)

Proteína	G5	G13	G7	G15
Histatina 1	0,13	0,17	0,24	0,19
Histatina 3	0,55	0,24	0,26	0,28
Histatina 5	0,80	0,73	0,80	0,54

Tabela 7.7 - Quantidade de histatinas 1,3 e 5 (μg) na saliva parótidea dos grupos de Moebius e controle com fluxo salivar acima da média (G6, G14, G8 e G16)

Proteína	G6	G14	G8	G16
Histatina 1	0,18	0,30	0,28	0,15
Histatina 3	0,12	0,55	0,28	0,15
Histatina 5	1,06	1,52	1,38	1,23

Figura 7.11 - Quantificação de histatina 1, 3 e 5 (em μg) provenientes em 25 μg de saliva parotídea esquerda e direita acima da média de fluxo do grupo (G5, G13, G7, G15) através da eletroforese em gel de poliacrilamida (native cationic)

Figura 17.12 - Quantificação de histatina 1, 3 e 5 (em μg) provenientes em 25 μg de saliva parotídea esquerda e direita acima da média de fluxo do grupo (G6, G14, G8, G16) através da eletroforese em gel de poliacrilamida (native cationic)

7.3 Teste imunoenzimático (Elisa)

Em relação a quantificação de amilase salivar, houve diferença estatística ($p < 0,05$) entre os grupos G2XG10, G4XG12, G5XG13 e G6XG14. Os outros grupos não apresentaram diferença estatística, sempre que comparado grupos de indivíduos com SM com controle (Figura 7.13).

Figura 7.13 - Teste de ELISA com anticorpo anti-amilase (1:1000). A chave mostra a comparação realizada entre os grupos e * representa $p < 0,05$. Grupos de indivíduos com SM (G1 e G8) e controle (G9 e G16).

8 DISCUSSÃO

As alterações bucais encontradas em indivíduos com SM, tais como maior índice periodontal (PSR) e maior índice de cárie, denotam a importância de um maior aprofundamento em relação à composição salivar de indivíduos com SM. Uma vez que o fluxo salivar desses indivíduos encontra-se alterado e a SM envolve nervos responsáveis pela inervação das glândulas salivares, a nossa hipótese foi que a composição proteica da saliva desses indivíduos também estaria alterada. A secreção proteica salivar ocorre devido o processo de exocitose principalmente das células acinares. Esse processo é regulado pelo sistema nervoso simpático e parassimpático nas glândulas salivares maiores. A secreção proteica é controlada pelo sistema nervoso autônomo que através da inervação simpática estimula a liberação de proteínas dos ácinos presentes nas glândulas parótida e submandibulares. A inervação parassimpática induz o mesmo processo nos ácinos das glândulas sublinguais bem como das glândulas parótidas (103, 206, 207).

Através da análise dos diagramas de Venn é possível notar que as amostras de saliva de indivíduos com SM apresentam menor número de proteínas identificadas do que indivíduos controle, com exceção da saliva estimulada. Mais ainda, na saliva parotídea essa característica se acentua, ou seja, havia muito mais proteínas identificadas na saliva do grupo controle (1.378) do que do grupo SM. Essa alteração na saliva estimulada pode ser justificada pela participação de outros fatores na composição da saliva total (estimulada e não estimulada), tais como transudato da mucosa oral, fluído crevicular, muco da cavidade nasal e faringe, células epiteliais descamadas, produtos bacterianos, entre outros (47, 69). Uma vez que o fluxo salivar desses indivíduos encontrava-se diminuído, sugere-se que a SM afete também o perfil proteico da saliva desses indivíduos. Outro fator interessante é o tipo de estímulo aplicado para o estímulo da saliva total (mastigação) e parotídea (gustatório), o que pode ter influenciado na secreção de proteínas. Uma vez que o paladar de indivíduos de SM pode encontrar-se alterado devido ao acometimento do nervo facial e possível acometimento do glossofaríngeo em alguns indivíduos, o estímulo exclusivamente gustatório pode estar diminuído nesses indivíduos.

Essa mesma análise, utilizando o Diagrama de Venn, pode ser realizada para indivíduos com a mesma condição (SM ou controle) mas com fluxo salivar diferente. Desse modo, pode-se avaliar a possível influência do fluxo salivar no perfil proteico. É possível notar que para saliva não estimulada do grupo SM (G1 e G2) e controle (G9 e G10) houve um aumento no número de proteínas identificadas para indivíduos com baixo fluxo (G2e G10), quando

comparados aos seus pares com fluxo mais alto (G1 e G9). Praticamente o mesmo padrão foi observado para a saliva parotídea bilateral, contudo, com uma discrepância não tão acentuada na quantidade de proteínas identificadas. Contudo, para saliva estimulada nota-se o oposto, um maior número de proteínas identificadas para indivíduos com fluxo superior (G3 e G11), quando comparado aos seus pares com fluxo abaixo da média (G4 e G12). Essa alteração encontrada no número de proteínas identificadas na saliva estimulada, tanto de indivíduos controle quanto SM, pode estar associada ao tipo de estímulo aplicado para coleta da saliva, ou seja, estímulo mecânico. Sabe-se que diferentes estímulos influenciam de maneira distinta na síntese e secreção proteica na saliva (208). Os resultados encontrados para saliva não estimulada, em relação ao fluxo, corroboram os achados de Wu et al. (209), que notou que um grupo de adolescentes apresentavam aumento do fluxo salivar mas redução da secreção de proteína total. Nesse contexto, devido à escassez de trabalhos sobre o assunto, seria interessante a realização de novos estudos que avaliem o perfil proteico em relação ao fluxo salivar, utilizando para isso LC-ESI-MS/MS, considerada o padrão ouro para esse tipo de análise.

Em relação à abundância de proteínas, quando comparados grupos SM com grupos controle, foi possível notar que algumas proteínas estavam presentes com mais abundância em indivíduos com síndrome de Moebius. As cistatinas S e SN foram mais abundantes na saliva não estimulada de indivíduos controle, enquanto que a cistatina B foi mais abundante no grupo controle quando comparado ao grupo SM apenas para o grupo com fluxo acima da média (G9XG1). Acredita-se que a cistatina S iniba o crescimento de *Porphyromonas gingivalis*, um patógeno importante para a progressão da doença periodontal (141). Outros estudos demonstraram que indivíduos saudáveis apresentaram maior concentração de cistatina S quando comparados com indivíduos com periodontite (145). A cistatina SN possui capacidade de inibir (*in vitro*) catepsinas (B, H e L), umas das proteases responsáveis pela degradação e destruição periodontal tecidual (210). A cistatina B parece regular para baixo (down-regulate) a atividade intracelular de catepsina K e desse modo diminui a reabsorção óssea, uma vez que a catepsina K é a principal proteinase osteoclástica associada a esse processo (211). Indivíduos com SM também apresentaram redução da proteína histone. Sabe-se que essa proteína participa da sinalização celular, inibe angiogênese, regula negativamente a resposta inflamatória e exerce papel protetor no osso (212). Outra característica importante das cistatinas é que elas mantêm o estado de supersaturação da saliva. Os indivíduos com SM avaliados no presente estudo apresentaram índice periodontal superior aos controles e diminuição de cistatinas (S, SN e B) e histone.

O papel das cistatinas no processo de cárie não está bem estabelecido. Hong et al. (213) observaram aumento de cistatinas C, SN e S em indivíduos com alto cárie quando comparados a indivíduos livres de cárie. De maneira conflitante, Vitorino et al. (197) notaram que cistatinas S e SN encontradas na película adquirida de indivíduos livres de carie apresentaram forte correlação com baixos índices de cárie e parecem exercer efeito inibidor na degradação de outras proteínas salivares. No presente estudo, os indivíduos com SM apresentaram índice de cárie elevado e redução das cistatinas.

Acredita-se que fatores de ambos os ramos do sistema nervoso autônomo, simpático e parassimpático, participem na expressão do gene cistatina S na glândula submandibular (214, 215). Além disso, quando ocorre supressão parassimpática unilateral, a variante contra lateral dessa inervação possa dispor de uma resposta neurocompensatória para o gene cistatina S em resposta a um agonista B adrenérgico isoproterenol. Ademais, nota-se quase a mesma diminuição de RNAm de cistatina S quando ocorre remoção da inervação simpática ou parassimpática da glândula submandibular. Esse fato pode ocorrer devido à similaridade de neuropeptídeos e ou neurotransmissores envolvidos na regulação da expressão do gene cistatina S (214). Portanto, indivíduos com SM podem apresentar expressão desse gene modificada, uma vez que a síndrome acomete o nervo facial, responsável pela inervação autônoma das glândulas submandibulares. Mais ainda, a atividade compensatória descrita quando apenas um lado é suprimido provavelmente encontra-se modificada, uma vez que a síndrome acomete os dois lados com frequência. Dos 15 indivíduos com SM avaliados no presente estudo, apenas 1 apresentava acometimento facial unilateral pelo nervo facial.

Não foi possível correlacionar o fluxo salivar com a abundância de proteínas, quando foram analisados pares com fluxo acima e abaixo. Diante do achado, sugere-se que a alteração encontrada nos indivíduos com SM pode não estar associada à diminuição de fluxo salivar diminuído nesses indivíduos. Contudo, torna-se necessário uma amostra maior para que essa hipótese seja confirmada.

As histatinas, observadas através da eletroforese em gel de poliacrilamida (native cationic), encontraram-se elevadas na saliva parotídea de indivíduos com SM. Esse achado pode ter ocorrido devido à maior produção dessas proteínas pelos indivíduos com SM quando comparados aos controles. Outra hipótese está relacionada a susceptibilidade das histatinas à degradação proteica, que embora seja mais exacerbada na saliva total também acomete a saliva parotídea. Um exemplo é a presença de produtos resultantes da clivagem de histatina 3 na saliva

parotídea (216). Com base no exposto, os indivíduos com SM podem apresentar maior concentração devido a maior estabilidade (menor degradação) dessas proteínas.

Os resultados imunoenzimáticos revelaram uma maior quantidade de amilase salivar para indivíduos com SM. Cerca de 80% da amilase salivar é sintetizada nas glândulas parótidas (103). Estudos demonstraram que o sistema nervoso parassimpático exerce uma função sinérgica ao simpático na produção de amilase salivar (59). O sistema nervoso simpático, através de estímulo de mecanismo β -adrenergicos e α -adrenergicos, desempenha um papel fundamental na secreção de amilase salivar. Sabe-se que as vias eferentes parassimpáticas das glândulas sublinguais e submandibulares originam-se do nervo facial e da glândula parótida originam-se do nervo glossofaríngeo (103). As vias simpáticas pós-ganglionares são provenientes do gânglio cervical da cadeia simpática. Contudo o papel do sistema nervoso simpático e parassimpático, isoladamente e sinergicamente, parece muito mais complexo e ainda não está completamente elucidado (54). Com base no exposto, duas hipóteses podem justificar a maior quantidade de amilase salivar em nesses indivíduos. A primeira estaria relacionada a uma menor taxa de degradação de amilase salivar nos indivíduos com SM. A segunda hipótese estaria associada a uma maior produção de amilase salivar devido influência do sistema nervoso simpático e parassimpático. Por isso, torna-se extremamente difícil estabelecer como esses sistemas influenciariam na secreção da amilase salivar nos indivíduos com SM.

No presente estudo foram utilizadas duas técnicas distintas para identificação proteica: eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) e a cromatografia líquida associada à espectrometria de massa. Como descrito, foi observado maior abundancia de cistinas S, SN e B nos indivíduos controle através da técnica nLC-ESI-MS/MS. O contrário foi observado através da análise das intensidades das bandas dos géis SDS-PAGE, onde observou-se uma maior abundância dessas proteínas no grupo SM quando analisadas. A banda da amilase salivar também apresentou ligeira alteração quando comparado os grupos de saliva estimulada, não estimulada e parotídea bilateral (acima e abaixo do fluxo). Essa diferença foi maior para a comparação entre os grupos G10XG2, onde a banda da amilase apresentou intensidade 8,8% superior no G2. Todas as outras bandas de amilase apresentaram diferença inferior a 5% para todos as comparações entre grupos SM com grupos controle (G1XG9, G3XG11, G4XG12, G5XG13, G6XG14, G7XG15 e G8XG16). Esses achados corroboram os resultados encontrados através da técnica nLC-ESI-MS/MS.

Ao longo dos últimos 30 anos, diferentes metodologias têm sido desenvolvidas para eletroforese em gel de poliacrilamida, visando solucionar os diferentes problemas. A eletroforese em gel de poliacrilamida unidimensional é uma ferramenta simples, barata e altamente sensível no estudo das proteínas. Dentre as diferentes apresentações dessa técnica, o sistema de eletroforese descontínuo contendo poliacrilamida e dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) é a mais utilizada para fracionar as proteínas conforme seu tamanho (217). Os géis de poliacrilamida podem ser corados com diferentes substâncias, entre elas destacam-se Coomassie Brilliant Blue (CBB) e métodos de coloração de prata. Esse segundo método de coloração é consideravelmente mais sensível e permite a detecção de pequenas quantidades, em nanogramas, de proteínas. Contudo a análise proteica por géis de poliacrilamida pode não ser muito apreciada, em partes devido à dificuldade de quantificar as proteínas coradas com precisão (218). Outro problema que pode ser encontrado na técnica SDS-PAGE é a migração anormal das glicoproteínas, resultando em um peso molecular diferente conforme a concentração do gel. Isso ocorre devido à característica hidrofílica de sua porção glicano, que causa redução na interação hidrofóbica entre a proteína e o SDS, impedindo a correta ligação da mesma ao SDS (219).

Atualmente, métodos de proteômica reconhecidos como “state of art” têm se mostrado bastante promissores na análise de peptídeos e proteínas salivares. Essa abordagem consiste no emprego de várias ferramentas para caracterizar as proteínas expressas a partir de determinado genoma (220). O uso dessas ferramentas permitiu não só a identificações das proteínas mais conhecidas (como amilase, MUC 5B, histatinas, cistatinas, etc) como também um grande número de traços de proteínas, até então desconhecidas, foram detectas na saliva (221). Dentre os diversos métodos de quantificação de proteínas descritos na literatura, a espectrometria tornou-se uma das principais tecnologias para a análise proteômica, devido a sua alta precisão e sensibilidade para medição da massa dos peptídeos e proteínas, o que viabiliza a identificação de macromoléculas (222).

A técnica proteômica padrão envolve a separação das proteínas por eletroforese em gel bidimensional e sua evidenciação por coloração. Para identificar as proteínas, as bandas de interesse são removidas e digeridas com tripsina. Após isso, elas são submetidas à Ionização e dessorção a laser assistida por matriz associadas ao espectrômetro de massas (MALDI-MS) para obtenção da massa molecular dos peptídeos. Adicionalmente, informações suplementares acerca da sequência podem ser obtidas por cromatografia líquida associada à espectrometria de massa, uma vez que essa ferramenta fornece uma identificação mais precisa (223, 224). Uma

técnica alternativa, que pode ser utilizada para identificação de proteínas, é conhecida como “shotgun”. Essa abordagem é mais rápida pois elimina a fase de separação pelo gel de eletroforese. A abordagem “shotgun” é baseada na clivagem, química ou enzimática, de uma mistura complexa de proteínas (como a saliva), seguida pela sua classificação através da cromatografia (225).

Nos últimos anos houve um aumento na quantidade de publicações relacionadas ao proteoma salivar e à espectrometria de massa, o que consequentemente acarretou no aumento significativo do número de proteínas descritas (221).

Hu (225) propõem a identificação proteica através da abordagem “shotgun” e da eletroforese em gel bidimensional seguida pela espectrometria de massa. Os autores observaram que, de modo geral, a abordagem “shotgun” abrangeu proteínas dentro das escalas mais amplas de ponto isoelétrico e de massa molecular do que a eletroforese bidimensional associada à espectrometria de massa. 2-DE / MS. Apenas a abordagem “shotgun” foi capaz de identificar proteínas pequenas como proteínas ricas em prolina, estatéricas, histatinas e defensinas. As menores proteínas identificadas pela eletroforese bidimensional associada à espectrometria de massa foram as cistatinas e cadeias de imunoglobulina, que apresentaram mais do que 10 kDa. A abordagem “shotgun” foi capaz de identificar tanto proteínas pequenas (<10kDa) quanto proteínas maiores (>100kDa), que não foram identificadas pela outra técnica. Esses achados reiteram a escolha da técnica para identificação de proteínas no nosso estudo, demonstrando sua grande eficácia e facilidade de execução quando comparada à técnica tradicional (eletroforese em gel bidimensional seguida pela espectrometria de massa).

Não há estudos que comparem a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE com a cromatografia líquida associada à espectrometria de massa. Contudo as informações expostas corroboram as diferenças observadas no nosso trabalho entre as duas técnicas, onde foi observado que a primeira técnica apresenta baixa especificidade e algumas outras limitações, tais como identificação de glicoproteínas e dificuldade na quantificação.

Dessa forma, o presente trabalho mostrou que indivíduos com SM apresentaram tanto alteração na abundância de algumas proteínas (como cistatinas S, SN e B) quanto modificação na quantidade de proteínas identificadas. Essa alteração pôde ser evidenciada mais precisamente através do emprego cromatografia líquida associada à espectrometria de massa.

9 CONCLUSÕES

- O fluxo salivar diminuído, capacidade tampão menos eficiente, e aumento da atividade da amilase salivar apresentado pelos indivíduos com SM explicam, em parte, a maior ocorrência de cárie observada nesse grupo;
- Indivíduos com SM exibiram mais frequentemente doença periodontal e gengivite embora não apresentassem maior quantidade de placa que o grupo controle;
- Foram poucas as alterações encontradas no perfil proteico da saliva de pessoas afetadas pela SM, sendo a mais relevante, a diminuição das cistatinas.

REFERÊNCIAS

1. Wayne M, Wang W, Bratcher J, Cumani B, Kasmin F, Cooperman A. Renal cell cancer without a renal primary. *World Journal of Surgical Oncology*. 2010;8:3.
2. Sudarshan A, Goldie WD. The spectrum of congenital facial diplegia (Moebius syndrome). *Pediatric Neurology*. 1985;1(3):180-4.
3. Kumar D. Moebius syndrome. *Journal of Medical Genetics*. 1990;27(2):122-6.
4. Domingos A, Lopes S, Almeida S, Boscolo F, Whaites E. Poland–Moebius Syndrome: a case with oral anomalies. *Oral Diseases*. 2004;10(6):404-7.
5. De Serpa Pinto MV, De Magalhaes MH, Nunes FD. Moebius syndrome with oral involvement. *International Journal of Paediatric Dentistry*. 2002;12(6):446-9.
6. Ha CY, Messieha ZS. Management of a patient with Mobius syndrome: a case report. *Special Care in Dentistry*. 2003;23(3):111-6.
7. Yeh C-K, Johnson D, Dodds M, Sakai S, Rugh J, Hatch J. Association of salivary flow rates with maximal bite force. *Journal of Dental Research*. 2000;79(8):1560-5.
8. Ikebe K, Matsuda K-i, Kagawa R, Enoki K, Yoshida M, Maeda Y, et al. Association of masticatory performance with age, gender, number of teeth, occlusal force and salivary flow in Japanese older adults: Is ageing a risk factor for masticatory dysfunction? *Archives of Oral Biology*. 2011;56(10):991-6.
9. Sjogreen L, Andersson-Norinder J, Jacobsson C. Development of speech, feeding, eating, and facial expression in Mobius sequence. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*. 2001;60(3):197-204.
10. Verzijl HT, van der Zwaag B, Cruysberg JR, Padberg GW. Mobius syndrome redefined: a syndrome of rhombencephalic maldevelopment. *Neurology*. 2003;61(3):327-33.
11. Broussard AB, Borazjani JG. The faces of Moebius syndrome: recognition and anticipatory guidance. *MCN: The American Journal of Maternal/Child Nursing*. 2008;33(5):272-8.

12. AMOB AmdB. Boletim Informativo da Associação Moebius do Brasil - AMoB -. 2007;5(7):1.
13. Thomas H. Congenital facial paralysis. *The Journal of Nervous and Mental Disease*. 1898;25(8):571-93.
14. Pitner SE, Edwards JE, McCormick WF. Observations on the pathology of the Moebius syndrome. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*. 1965;28(4):362.
15. Verzijl HT, van der Zwaag B, Cruysberg JR, Padberg GW. Möbius syndrome redefined A syndrome of rhombencephalic maldevelopment. *Neurology*. 2003;61(3):327-33.
16. Carta A, Mora P, Neri A, Favilla S, Sadun AA. Ophthalmologic and Systemic Features in Möbius Syndrome: an italian case series. *Ophthalmology*. 2011;118(8):1518-23.
17. MacKinnon S, Oystreck DT, Andrews C, Chan W-M, Hunter DG, Engle EC. Diagnostic distinctions and genetic analysis of patients diagnosed with Moebius syndrome. *Ophthalmology*. 2014;121(7):1461-8.
18. Briegel W, Schimek M, Kamp-Becker I, Hofmann C, Schwab KO. Autism spectrum disorders in children and adolescents with Moebius sequence. *European Child & Adolescent Psychiatry*. 2009;18(8):515-9.
19. Bandim JM, Ventura LO, Miller MT, Almeida HC, Costa AE. Autism and Mobius sequence: an exploratory study of children in northeastern Brazil. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*. 2003;61(2A):181-5.
20. Gillberg C, Steffenburg S. Autistic behaviour in Moebius syndrome. *Acta Paediatrica Scandinavica*. 1989;78(2):314-6.
21. Çetin İİ, Aktaş D, Tunçbilek E. Ipsilateral foot and controlateral hand anomalies in a patient with Poland–Moebius syndrome. *European Journal of Medical Genetics*. 2005;48(2):183-7.
22. Losito L, Gennaro L, Cacudi M, De Rinaldis M, Trabacca A. Moebius Syndrome and Hydrosyringomyelia Description of a New Association. *Journal of Child Neurology*. 2013;28(6):798-801.
23. MacKinnon S, Oystreck DT, Andrews C, Chan W-M, Hunter DG, Engle EC. Diagnostic Distinctions and Genetic Analysis of Patients Diagnosed with Moebius Syndrome. *Ophthalmology*. 2014.

24. Pirmez R, Freitas MET, Gasparetto EL, Araújo AP. Moebius syndrome and holoprosencephaly following exposure to misoprostol. *Pediatric Neurology*. 2010;43(5):371-3.
25. Hashimoto N, Sakakihara Y, Miki Y, Kagawa J, Egi S, Kamoshita S. Moebius syndrome associated with pituitary dwarfism and hypoplastic optic disc. *Pediatrics International*. 1993;35(2):144-7.
26. Verzijl HT, Padberg GW, Zwarts MJ. The spectrum of Möbius syndrome: an electrophysiological study. *Brain*. 2005;128(7):1728-36.
27. Gorlin RJ, Cohen MM, Hennekam RCM. *Syndromes of the Head and Neck*. New York: Oxford University Press; 2001.
28. Verzijl H, Van Der Zwaag B, Lammens M, Ten Donkelaar H, Padberg G. The neuropathology of hereditary congenital facial palsy vs Möbius syndrome. *Neurology*. 2005;64(4):649-53.
29. Magalhães M, Araújo LCA, Chiaradia C, Fraige A, Zamunaro M, Mantesso A. Early dental management of patients with Mobius syndrome. *Oral Diseases*. 2006;12(6):533-6.
30. Aren G. Mobius syndrome: a case report. *Journal of Clinical Pediatric Dentistry*. 2003;26(2):207-9.
31. Ortega AdOL, Marques-Dias MJ, Santos MTBRd, Castro T, Gallottini M. Oral motor assessment in individuals with Moebius syndrome. *Journal of Oral Pathology & Medicine*. 2014;43(2):157-61.
32. Towfighi J, Marks K, Palmer E, Vannucci R. Möbius syndrome. *Acta Neuropathologica*. 1979;48(1):11-7.
33. Kadakia S, Helman SN, Schwedhelm T, Saman M, Azizzadeh B. Examining the genetics of congenital facial paralysis—a closer look at Moebius syndrome. *Oral and Maxillofacial Surgery*. 2015:1-8.
34. Bavinck JNB, Weaver DD, Opitz JM, Reynolds JF. Subclavian artery supply disruption sequence: Hypothesis of a vascular etiology for Poland, Klippel-Feil, and Möbius anomalies. *American Journal of Medical Genetics*. 1986;23(4):903-18.
35. Courtens W, Vamos E, Hainaut M, Vergauwen P. Moebius syndrome in an infant exposed in utero to benzodiazepines. *The Journal of Pediatrics*. 1992;121(5):833-4.

36. Elsahy NI. Moebius syndrome associated with the mother taking thalidomide during gestation. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 1973;51(1):93-5.
37. Puvabanditsin S, Garrow E, Augustin G, Titapiwatanakul R, Kuniyoshi KM. Poland-Möbius syndrome and cocaine abuse: a relook at vascular etiology. *Pediatric Neurology*. 2005;32(4):285-7.
38. Smets K, Zecic A, Willems J. Ergotamine as a possible cause of Möbius sequence: additional clinical observation. *Journal of Child Neurology*. 2004;19(5):398-.
39. Pastuszak AL, Schüller L, Speck-Martins CE, Coelho K-EF, Cordello SM, Vargas F, et al. Use of misoprostol during pregnancy and Möbius' syndrome in infants. *New England Journal of Medicine*. 1998;338(26):1881-5.
40. da Silva Dal Pizzol T, Knop FP, Mengue SS. Prenatal exposure to misoprostol and congenital anomalies: systematic review and meta-analysis. *Reproductive Toxicology*. 2006;22(4):666-71.
41. Vargas FR, Schuler-Faccini L, Brunoni D, Kim C, Meloni VF, Sugayama SM, et al. Prenatal exposure to misoprostol and vascular disruption defects: a case-control study. *American Journal of Medical Genetics*. 2000;95(4):302-6.
42. Coelho HL, Teixeira AC, Santos AP, Forte EB, Morais SM, La Vecchia C, et al. Misoprostol and illegal abortion in Fortaleza, Brazil. *Lancet*. 1993;341(8855):1261-3.
43. Marques-Dias MJ, Gonzalez CH, Rosemberg S. Mobius sequence in children exposed in utero to misoprostol: neuropathological study of three cases. *Birth Defects Research*. 2003;67(12):1002-7.
44. Nunes ML, Friedrich MA, Loch LF. Association of misoprostol, Moebius syndrome and congenital central alveolar hypoventilation. Case report. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*. 1999;57(1):88-91.
45. Webb BD, Shaaban S, Gaspar H, Cunha LF, Schubert CR, Hao K, et al. HOXB1 founder mutation in humans recapitulates the phenotype of Hoxb1^{-/-} mice. *The American Journal of Human Genetics*. 2012;91(1):171-9.
46. Van Der Zwaag B, Verzijl H, De Bernabe DB-V, Schuster V, Van Bokhoven H, Kremer H, et al. Mutation analysis in the candidate Möbius syndrome genes PGT and GATA2 on chromosome 3 and EGR2 on chromosome 10. *Journal of Medical Genetics*. 2002;39(6):e30-e.

47. Humphrey SP, Williamson RT. A review of saliva: normal composition, flow, and function. *The Journal of Prosthetic Dentistry*. 2001;85(2):162-9.
48. Ekström J, Khosravani N, Castagnola M, Messana I. Saliva and the control of Its secretion. *Dysphagia: Springer*; 2012. p. 19-47.
49. FenolI-Palomares C, Muñoz-Montagud J, Sanchiz V, Herreros B, Hernández V, Mínguez M, et al. Unstimulated salivary flow rate, pH and buffer capacity of saliva in healthy volunteers. *Revista Espanola de Enfermedades Digestivas*. 2004;96(11):773-83.
50. Carpenter GH. The secretion, components, and properties of saliva. *Annual Review of Food Science and Technology*. 2013;4:267-76.
51. Navazesh M. Methods for collecting saliva. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1993;694(1):72-7.
52. Edgar W. Saliva and dental health. Clinical implications of saliva: report of a consensus meeting. *British Dental Journal*. 1989;169(3-4):96-8.
53. Dawes C, Watanabe S. The effect of taste adaptation on salivary flow rate and salivary sugar clearance. *Journal of Dental Research*. 1987;66(3):740-4.
54. Garrett J. Glandular mechanisms of salivary secretion. Vol 10. NewYork : Karger. 1998. 226p.
55. Minicucci E, Pires R, Vieira R, Miot H, Sposto M. Assessing the impact of menopause on salivary flow and xerostomia. *Australian Dental Journal*. 2013;58(2):230-4.
56. Mirzaii-Dizgah I, Agha-Hosseini F. Stimulated and unstimulated saliva progesterone in menopausal women with oral dryness feeling. *Clinical Oral Investigations*. 2011;15(6):859-62.
57. Lee MG, Ohana E, Park HW, Yang D, Muallem S. Molecular mechanism of pancreatic and salivary gland fluid and HCO₃⁻ secretion. *Physiological Reviews*. 2012;92(1):39-74.
58. de Oliveira MG. Manual de anatomia da cabeça e do pescoço. 4a ed. Rio Grande do Sul: EDIPUCRS; 2002. 135 p.

59. Asking B. Sympathetic stimulation of amylase secretion during a parasympathetic background activity in the rat parotid gland. *Acta Physiologica Scandinavica*. 1985;124(4):535-42.
60. Anderson L, Garrett J, Johnson D, Kauffman D, Keller P, Thulin A. Influence of circulating catecholamines on protein secretion into rat parotid saliva during parasympathetic stimulation. *The Journal of Physiology*. 1984;352(1):163-71.
61. Asking B, Proctor G. Parasympathetic activation of amylase secretion in the intact and sympathetically denervated rat parotid gland. *Quarterly Journal of Experimental Physiology*. 1989;74(1):45-52.
62. van Stegeren A, Rohleder N, Everaerd W, Wolf OT. Salivary alpha amylase as marker for adrenergic activity during stress: effect of betablockade. *Psychoneuroendocrinology*. 2006;31(1):137-41.
63. Endoh T. Modulation of voltage-dependent calcium channels by neurotransmitters and neuropeptides in parasympathetic submandibular ganglion neurons. *Archives of Oral Biology*. 2004;49(7):539-57.
64. Standring S, Ellis H, Healy J, Johnson D, Williams A, Collins P, et al. Gray's anatomy: the anatomical basis of clinical practice. *American Journal of Neuroradiology*. 2005;26(10):2703.
65. Matsuo R. Central connections for salivary innervations and efferent impulse formation. In: Garrett JR, Ekström J, Anderson LC. *Neural mechanisms of salivary gland secretion*. New York: Karger. 1999;11:26-43.
66. Proctor GB, Carpenter GH. Regulation of salivary gland function by autonomic nerves. *Autonomic Neuroscience*. 2007;133(1):3-18.
67. Ekström J. Role of nonadrenergic, noncholinergic autonomic transmitters in salivary glandular activities in vivo. In: Garrett JR, Ekström J, Anderson LC. *Neural mechanisms of salivary gland secretion*. New York: Karger. 1999;6:94-130.
68. Melvin JE, Yule D, Shuttleworth T, Begenisich T. Regulation of fluid and electrolyte secretion in salivary gland acinar cells. *Annual Review of Physiology*. 2005;67:445-69.
69. De Almeida PDV, Grégio AMT, Machado MAN, de Lima AAS, Azevedo LR. Saliva composition and functions: a comprehensive review. *The journal of Contemporary Dental Practice*. 2008(9):72-80.

70. Humphrey SP, Williamson RT. A review of saliva: normal composition, flow, and function. *The Journal of Prosthetic Dentistry*. 2001;85(2):162-9.
71. Navazesh M, Christensen C, Brightman V. Clinical criteria for the diagnosis of salivary gland hypofunction. *Journal of Dental Research*. 1992;71(7):1363-9.
72. Navazesh M, Mulligan R, Kipnis V, Denny P, Denny P. Comparison of whole saliva flow rates and mucin concentrations in healthy Caucasian young and aged adults. *Journal of Dental Research*. 1992;71(6):1275-8.
73. Ship JA, Fox PC, Baum BJ. How much saliva is enough? 'Normal' function defined. *Journal of the American Dental Association*. 1991;122(3):63-9.
74. García-Godoy F, Hicks MJ. Maintaining the integrity of the enamel surface: the role of dental biofilm, saliva and preventive agents in enamel demineralization and remineralization. *The Journal of the American Dental Association*. 2008;139:25S-34S.
75. Buzalaf MAR, Hannas AR, Kato MT. Saliva and dental erosion. *Journal of Applied Oral Science*. 2012;20(5):493-502.
76. Hay D, Schluckebier S, Moreno E. Saturation of human salivary secretions with respect to calcite and inhibition of calcium carbonate precipitation by salivary constituents. *Calcified Tissue International*. 1986;39(3):151-60.
77. McCann H. Inorganic components of salivary secretions. *Art and science of dental caries research*. New York: Academic Press. 1968. p. 55-73.
78. Larsen M, Pearce E. Saturation of human saliva with respect to calcium salts. *Archives of Oral Biology*. 2003;48(4):317-22.
79. Schlesinger DH, Hay D. Complete covalent structure of statherin, a tyrosine-rich acidic peptide which inhibits calcium phosphate precipitation from human parotid saliva. *Journal of Biological Chemistry*. 1977;252(5):1689-95.
80. Hay DI, Smith DJ, Schluckebier SK, Moreno EC. Relationship between concentration of human salivary statherin and inhibition of calcium phosphate precipitation in stimulated human parotid saliva. *Journal of Dental Research*. 1984;63(6):857-63.
81. Fejerskov O, Kidd EA, Fejerskov O, Kidd EA. *Dental caries: the disease and its clinical management*. Oxford: Blackwell. 2003. 640 p.

82. Tenovuo J. Salivary parameters of relevance for assessing caries activity in individuals and populations. *Community Dentistry and Oral Epidemiology*. 1997;25(1):82-6.
83. Bardow A, Moe D, Nyvad B, Nauntofte B. The buffer capacity and buffer systems of human whole saliva measured without loss of CO₂. *Archives of Oral Biology*. 2000;45(1):1-12.
84. Carpenter G, Garrett J, Hartley R, Proctor G. The influence of nerves on the secretion of immunoglobulin A into submandibular saliva in rats. *The Journal of Physiology*. 1998;512(2):567-73.
85. Mega J, McGhee JR, Kiyono H. Cytokine-and Ig-producing T cells in mucosal effector tissues: analysis of IL-5-and IFN-gamma-producing T cells, T cell receptor expression, and IgA plasma cells from mouse salivary gland-associated tissues. *The Journal of Immunology*. 1992;148(7):2030-9.
86. Brandtzaeg P. Synthesis and secretion of human salivary immunoglobulins. In: Garrett J. *Glandular mechanisms of salivary secretion*. Vol 10. New York : Karger.Glandular. 1998;10:167-99.
87. Fábíán TK, Hermann P, Beck A, Fejérdy P, Fábíán G. Salivary defense proteins: their network and role in innate and acquired oral immunity. *International Journal of Molecular Sciences*. 2012;13(4):4295-320.
88. Berg RD, Savage DC. Immune responses of specific pathogen-free and gnotobiotic mice to antigens of indigenous and nonindigenous microorganisms. *Infection and Immunity*. 1975;11(2):320-9.
89. Veiga-Malta I, Duarte M, Dinis M, Tavares D, Videira A, Ferreira P. Enolase from *Streptococcus sobrinus* is an immunosuppressive protein†. *Cellular Microbiology*. 2004;6(1):79-88.
90. Casarin R, Del Peloso Ribeiro É, Mariano F, Nociti Jr F, Casati M, Gonçalves R. Levels of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, inflammatory cytokines and species-specific immunoglobulin G in generalized aggressive and chronic periodontitis. *Journal of Periodontal Research*. 2010;45(5):635-42.
91. Veerman E, Keybus Pvd, Vissink A, Amerongen A. Human glandular salivas: their separate collection and analysis. *European Journal of Oral Sciences*. 1996;104(4):346-52.
92. Nikitkova AE, Haase EM, Scannapieco FA. Taking the starch out of oral biofilm formation: molecular basis and functional significance of salivary α -amylase binding to oral streptococci. *Applied and Environmental Microbiology*. 2013;79(2):416-23.

93. Lee YH, Zimmerman JN, Custodio W, Xiao Y, Basiri T, Hatibovic-Kofman S, et al. Proteomic evaluation of acquired enamel pellicle during in vivo formation. *Plos One*. 2013;8(7):e67919.
94. Douglas C, Pease A, Whiley R. Amylase-binding as a discrimination among oral streptococci. *FEMS Microbiology Letters*. 1990;66(1-3):193-7.
95. Kilian M, Nyvad B. Ability to bind salivary alpha-amylase discriminates certain viridans group streptococcal species. *Journal of Clinical Microbiology*. 1990;28(11):2576-7.
96. Scannapieco F, Solomon L, Wadenya R. Emergence in human dental plaque and host distribution of amylase-binding streptococci. *Journal of Dental Research*. 1994;73(10):1627-35.
97. Nyvad B, Kilian M. Comparison of the initial streptococcal microflora on dental enamel in caries-active and in caries-inactive individuals. *Caries Research*. 1990;24(4):267-72.
98. Scannapieco FA, Torres G, Levine MJ. Salivary α -amylase: role in dental plaque and caries formation. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*. 1993;4(3):301-7.
99. Sethi A, Mohanty B, Ramasubbu N, Gooley PR. Structure of amylase-binding protein A of *Streptococcus gordonii*: A potential receptor for human salivary α -amylase enzyme. *Protein Science*. 2015.
100. Nikitkova A, Haase E, Scannapieco F. Effect of starch and amylase on the expression of amylase-binding protein A in *Streptococcus gordonii*. *Molecular Oral Microbiology*. 2012;27(4):284-94.
101. Craigen B, Dashiff A, Kadouri DE. The use of commercially available alpha-amylase compounds to inhibit and remove *Staphylococcus aureus* biofilms. *The Open Microbiology Journal*. 2011;5:21.
102. Okahashi N, Nakata M, Terao Y, Isoda R, Sakurai A, Sumitomo T, et al. Pili of oral *Streptococcus sanguinis* bind to salivary amylase and promote the biofilm formation. *Microbial Pathogenesis*. 2011;50(3):148-54.
103. Nater U, Rohleder N. Salivary alpha-amylase as a non-invasive biomarker for the sympathetic nervous system: current state of research. *Psychoneuroendocrinology*. 2009;34(4):486-96.

104. Laible N, Germaine G. Bactericidal activity of human lysozyme, muramidase-inactive lysozyme, and cationic polypeptides against *Streptococcus sanguis* and *Streptococcus faecalis*: inhibition by chitin oligosaccharides. *Infection and Immunity*. 1985;48(3):720-8.
105. Ibrahim HR, Thomas U, Pellegrini A. A helix-loop-helix peptide at the upper lip of the active site cleft of lysozyme confers potent antimicrobial activity with membrane permeabilization action. *Journal of Biological Chemistry*. 2001;276(47):43767-74.
106. Marquis G, Garzon S, Strykowski H, Auger P. Cell walls of normal and lysozyme-damaged blastoconidia of *Candida albicans*: localization of surface factor 4 antigen and vicinal-glycol staining. *Infection and Immunity*. 1991;59(4):1312-8.
107. Brandenburg K, Koch MH, Seydel U. Biophysical characterisation of lysozyme binding to LPS Re and lipid A. *European Journal of Biochemistry*. 1998;258(2):686-95.
108. Erridge C, Bennett-Guerrero E, Poxton IR. Structure and function of lipopolysaccharides. *Microbes and infection*. 2002;4(8):837-51.
109. Li J, Helmerhorst E, Yao Y, Nunn M, Troxler R, Oppenheim F. Statherin is an in vivo pellicle constituent: identification and immuno-quantification. *Archives of Oral Biology*. 2004;49(5):379-85.
110. Siqueira W, Custodio W, McDonald E. New insights into the composition and functions of the acquired enamel pellicle. *Journal of Dental Research*. 2012;0022034512462578.
111. Lindh L, Glantz P, Strömberg N, Arnebrant T. On the adsorption of human acidic proline-rich proteins (PRP-1 and PRP-3) and statherin at solid/liquid interfaces. *Biofouling*. 2002;18(2):87-94.
112. Shimotoyodome A, Kobayashi H, Tokimitsu I, Matsukubo T, Takaesu Y. Statherin and histatin 1 reduce parotid saliva-promoted *Streptococcus mutans* strain MT8148 adhesion to hydroxyapatite surfaces. *Caries Research*. 2005;40(5):403-11.
113. Gibbons R, Hay D. Adsorbed salivary acidic proline-rich proteins contribute to the adhesion of *Streptococcus mutans* JBP to apatitic surfaces. *Journal of Dental Research*. 1989;68(9):1303-7.
114. Gibbons R, Hay D, Cisar J, Clark W. Adsorbed salivary proline-rich protein 1 and statherin: receptors for type 1 fimbriae of *Actinomyces viscosus* T14V-J1 on apatitic surfaces. *Infection and Immunity*. 1988;56(11):2990.

115. Sekine S, Kataoka K, Tanaka M, Nagata H, Kawakami T, Akaji K, et al. Active domains of salivary statherin on apatitic surfaces for binding to *Fusobacterium nucleatum* cells. *Microbiology*. 2004;150(7):2373-9.
116. Nakagaki H, Sekine S, Terao Y, Toe M, Tanaka M, Ito H-O, et al. *Fusobacterium nucleatum* envelope protein FomA is immunogenic and binds to the salivary statherin-derived peptide. *Infection and Immunity*. 2010;78(3):1185-92.
117. Leito JT, Ligtenberg AJ, Nazmi K, Veerman EC. Identification of salivary components that induce transition of hyphae to yeast in *Candida albicans*. *FEMS Yeast Research*. 2009;9(7):1102-10.
118. Murakami Y, Nagata H, Amano A, Takagaki M, Shizukuishi S, Tsunemitsu A, et al. Inhibitory effects of human salivary histatins and lysozyme on coaggregation between *Porphyromonas gingivalis* and *Streptococcus mitis*. *Infection and Immunity*. 1991;59(9):3284-6.
119. Murakami Y, Xu T, Helmerhorst E, Ori G, Troxler R, Lally E, et al. Inhibitory effect of synthetic histatin 5 on leukotoxin from *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Oral Microbiology and Immunology*. 2002;17(3):143-9.
120. Gusman H, Travis J, Helmerhorst EJ, Potempa J, Troxler RF, Oppenheim FG. Salivary histatin 5 is an inhibitor of both host and bacterial enzymes implicated in periodontal disease. *Infection and Immunity*. 2001;69(3):1402-8.
121. Pusateri CR, Monaco EA, Edgerton M. Sensitivity of *Candida albicans* biofilm cells grown on denture acrylic to antifungal proteins and chlorhexidine. *Archives of Oral Biology*. 2009;54(6):588-94.
122. Konopka K, Dorocka-Bobkowska B, Gebremedhin S, Düzgüneş N. Susceptibility of *Candida* biofilms to histatin 5 and fluconazole. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2010;97(4):413-7.
123. Siqueira W, Margolis H, Helmerhorst E, Mendes F, Oppenheim F. Evidence of intact histatins in the in vivo acquired enamel pellicle. *Journal of Dental Research*. 2010;89(6):626-30.
124. Oudhoff MJ, Bolscher JG, Nazmi K, Kalay H, van't Hof W, Amerongen AVN, et al. Histatins are the major wound-closure stimulating factors in human saliva as identified in a cell culture assay. *The FASEB Journal*. 2008;22(11):3805-12.
125. Oudhoff MJ, Kroeze KL, Nazmi K, van den Keijbus PA, van't Hof W, Fernandez-Borja M, et al. Structure-activity analysis of histatin, a potent wound healing peptide from

human saliva: cyclization of histatin potentiates molar activity 1000-fold. *The FASEB Journal*. 2009;23(11):3928-35.

126. Oppenheim F, Xu T, McMillian F, Levitz S, Diamond R, Offner G, et al. Histatins, a novel family of histidine-rich proteins in human parotid secretion. Isolation, characterization, primary structure, and fungistatic effects on *Candida albicans*. *Journal of Biological Chemistry*. 1988;263(16):7472-7.

127. Sabatini L, Azen E. Histatins, a family of salivary histidine-rich proteins, are encoded by at least two loci (HIS1 and HIS2). *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1989;160(2):495-502.

128. Oppenheim FG, Salih E, Siqueira WL, Zhang W, Helmerhorst EJ. Salivary proteome and its genetic polymorphisms. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2007;1098(1):22-50.

129. McDonald E, Goldberg H, Tabbara N, Mendes F, Siqueira W. Histatin 1 resists proteolytic degradation when adsorbed to hydroxyapatite. *Journal of Dental Research*. 2011;90(2):268-72.

130. Komatsu T, Salih E, Helmerhorst EJ, Offner GD, Oppenheim FG. Influence of histatin 5 on *Candida albicans* mitochondrial protein expression assessed by quantitative mass spectrometry. *Journal of Proteome Research*. 2010;10(2):646-55.

131. Tsai H, Bobek LA. Human salivary histatin-5 exerts potent fungicidal activity against *Cryptococcus neoformans*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. 1997;1336(3):367-9.

132. Xu T, Levitz S, Diamond R, Oppenheim F. Anticandidal activity of major human salivary histatins. *Infection and immunity*. 1991;59(8):2549-54.

133. Helmerhorst EJ, Reijnders IM, van't Hof W, Simoons-Smit I, Veerman EC, Amerongen AVN. Amphotericin B- and Fluconazole-Resistant *Candida* spp., *Aspergillus fumigatus*, and other newly emerging pathogenic fungi are susceptible to basic antifungal peptides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1999;43(3):702-4.

134. Vukosavljevic D, Custodio W, Del Bel Cury A, Siqueira W. The effect of histatin 5, adsorbed on PMMA and hydroxyapatite, on *Candida albicans* colonization. *Yeast*. 2012;29(11):459-66.

135. Wei G-X, Bobek LA. In vitro synergic antifungal effect of MUC7 12-mer with histatin-5 12-mer or miconazole. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2004;53(5):750-8.

136. van't Hof W, Reijnders IM, Helmerhorst EJ, Walgreen-Weterings E, Simoons-Smit IM, Veerman EC, et al. Synergistic effects of low doses of histatin 5 and its analogues on amphotericin B anti-mycotic activity. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2000;78(2):163-9.
137. Li XS, Reddy MS, Baev D, Edgerton M. *Candida albicans* Ssa1/2p is the cell envelope binding protein for human salivary histatin 5. *Journal of Biological Chemistry*. 2003;278(31):28553-61.
138. Jang WS, Bajwa JS, Sun JN, Edgerton M. Salivary histatin 5 internalization by translocation, but not endocytosis, is required for fungicidal activity in *Candida albicans*. *Molecular Microbiology*. 2010;77(2):354-70.
139. Gorr SU. Antimicrobial peptides of the oral cavity. *Periodontology* 2000. 2009;51(1):152-80.
140. Amerongen A, Veerman E. Saliva—the defender of the oral cavity. *Oral Diseases*. 2002;8(1):12-22.
141. Blankenvoorde M, Van't Hof W, Walgreen-Weterings E, Van Steenberghe T, Brand H, Veerman E, et al. Cystatin and cystatin-derived peptides have antibacterial activity against the pathogen *Porphyromonas gingivalis*. *Biological Chemistry*. 1998;379(11):1371-5.
142. Ganeshnarayan K, Velliyagounder K, Furgang D, Fine D. Human salivary cystatin SA exhibits antimicrobial effect against *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Journal of Periodontal Research*. 2012;47(5):661-73.
143. Henskens Y, Veerman E, Mantel M, Van Der Velden U, Amerongen AN. Cystatins S and C in human whole saliva and in glandular salivas in periodontal health and disease. *Journal of Dental Research*. 1994;73(10):1606-14.
144. Henskens Y, Velden U, Veerman EC, Amerongen AV. Cystatin C levels of whole saliva are increased in periodontal patients. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1993;694(1):280-2.
145. Henskens YM, Veerman EC, Nieuw Amerongen A. Cystatins in health and disease. *Biological Chemistry-Hoppe Seyler*. 1996;377(2):71-86.
146. Shah A, Bano B. Cystatins in health and diseases. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*. 2009;15(1):43-8.
147. Takehara S, Yanagishita M, Podyma-Inoue KA, Kawaguchi Y. Degradation of MUC7 and MUC5B in Human Saliva. *Plos One*. 2013;8(7):e69059.

148. Derrien M, van Passel MW, van de Bovenkamp JH, Schipper R, de Vos W, Dekker J. Mucin-bacterial interactions in the human oral cavity and digestive tract. *Gut Microbes*. 2010;1(4):254-68.
149. Liu B, Lague JR, Nunes DP, Toselli P, Oppenheim FG, Soares RV, et al. Expression of membrane-associated mucins MUC1 and MUC4 in major human salivary glands. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 2002;50(6):811-20.
150. Barrera M-J, Aguilera S, Veerman E, Quest AF, Díaz-Jiménez D, Urzúa U, et al. Salivary mucins induce a Toll-like receptor 4-mediated pro-inflammatory response in human submandibular salivary cells: are mucins involved in Sjögren's syndrome? *Rheumatology*. 2015;kev026.
151. Wickstrom C, Davies J, Eriksen G, Veerman E, Carlstedt I. MUC5B is a major gel-forming, oligomeric mucin from human salivary gland, respiratory tract and endocervix: identification of glycoforms and C-terminal cleavage. *Biochemical Journal*. 1998;334:685-93.
152. Adler KB, Tuvim MJ, Dickey BF. Regulated mucin secretion from airway epithelial cells. *Frontiers in Endocrinology*. 2013;4.
153. Perez-Vilar J. Mucin granule intraluminal organization. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. 2007;36(2):183-90.
154. Levitov AB, Dallas AP, Slonim AD. *Bioquímica Ilustrada de Harper*. 29ed. Porto Alegre: AMGH. 2013. 826 p.
155. Tabak LA. Structure and function of human salivary mucins. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*. 1990;1(4):229-34.
156. Iontcheva I, Oppenheim F, Troxler R. Human salivary mucin MG1 selectively forms heterotypic complexes with amylase, proline-rich proteins, statherin, and histatins. *Journal of Dental Research*. 1997;76(3):734-43.
157. Wickström C, Svensäter G. Salivary gel-forming mucin MUC5B—a nutrient for dental plaque bacteria. *Oral Microbiology and Immunology*. 2008;23(3):177-82.
158. Wickström C, Herzberg MC, Beighton D, Svensäter G. Proteolytic degradation of human salivary MUC5B by dental biofilms. *Microbiology*. 2009;155(9):2866-72.
159. Murray P, Prakobphol A, Lee T, Hoover C, Fisher S. Adherence of oral streptococci to salivary glycoproteins. *Infection and Immunity*. 1992;60(1):31-8.

160. Reddy MS, Levine MJ, Paranchych W. Low-molecular-mass human salivary mucin, MG2: structure and binding of *Pseudomonas aeruginosa*. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*. 1993;4(3):315-23.
161. Groenink J, Ligtenberg A, Veerman E, Bolscher J, Amerongen AN. Interaction of the salivary low-molecular-weight mucin (MG2) with *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 1996;70(1):79-87.
162. Moshier A, Reddy MS, Scannapieco FA. Role of type 1 fimbriae in the adhesion of *Escherichia coli* to salivary mucin and secretory immunoglobulin A. *Current Microbiology*. 1996;33(3):200-8.
163. Liu B, Rayment S, Oppenheim FG, Troxler RF. Isolation of human salivary mucin MG2 by a novel method and characterization of its interactions with oral bacteria. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1999;364(2):286-93.
164. Liu B, Rayment S, GYURKO C, OPPENHEIM F, OFFNER G, Troxler R. The recombinant N-terminal region of human salivary mucin MG2 (MUC7) contains a binding domain for oral Streptococci and exhibits candidacidal activity. *Biochemical Journal*. 2000;345:557-64.
165. Wei G-X, Campagna AN, Bobek LA. Effect of MUC7 peptides on the growth of bacteria and on *Streptococcus mutans* biofilm. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2006;57(6):1100-9.
166. Groenink J, Walgreen-Weterings E, Nazmi K, Bolscher J, Veerman E, Van Winkelhoff A, et al. Salivary lactoferrin and low-Mr mucin MG2 in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-associated periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*. 1999;26(5):269-75.
167. Sengupta A, Valdramidou D, Huntley S, Hicks SJ, Carrington SD, Corfield AP. Distribution of MUC1 in the normal human oral cavity is localized to the ducts of minor salivary glands. *Archives of Oral Biology*. 2001;46(6):529-38.
168. Li X, Wang L, Nunes D, Troxler R, Offner G. Pro-inflammatory cytokines up-regulate MUC1 gene expression in oral epithelial cells. *Journal of Dental Research*. 2003;82(11):883-7.
169. Gendler SJ. MUC1, the renaissance molecule. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*. 2001;6(3):339-53.

170. McAuley JL, Linden SK, Png CW, King RM, Pennington HL, Gendler SJ, et al. MUC1 cell surface mucin is a critical element of the mucosal barrier to infection. *Journal of Clinical Investigation*. 2007;117(8):2313.
171. Silness J, Loe H. Periodontal disease in pregnancy II. Correlation between oral hygiene and periodontal condition. *Acta Odontologica*. 1964;22(1):121-35.
172. OMS. Levantamentos básicos em saúde bucal: Formulário de avaliação. São Paulo: Editora Santos. 1999.
173. Rohleder N, Nater UM. Determinants of salivary α -amylase in humans and methodological considerations. *Psychoneuroendocrinology*. 2009;34(4):469-85.
174. Atkinson J, Dawes C, Ericson T, Fox P, Gandara B, Mandel I. Guidelines for saliva nomenclature and collection. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 694 1993;694:pp. xi–xii.
175. Siqueira WL, Lee YH, Xiao Y, Held K, Wong W. Identification and characterization of histatin 1 salivary complexes by using mass spectrometry. *Proteomics*. 2012;12(22):3426-35.
176. Navazesh M, Kumar SK. Measuring salivary flow: challenges and opportunities. *The Journal of the American Dental Association*. 2008;139:35S-40S.
177. Siqueira WL, Bermejo PR, Mustacchi Z, Nicolau J. Buffer capacity, pH, and flow rate in saliva of children aged 2–60 months with Down syndrome. *Clinical Oral Investigations*. 2005;9(1):26-9.
178. Tanaka MH. Análise microbiológica e imunológica do fluido gengival e proteoma salivar de indivíduos com Síndrome de Down com doença periodontal. [tese]. Araraquara: Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia; 2014.
179. Bussab W, Morettin P. Estatística Básica. São Paulo: Editora Saraiva, 2002, 7ª tiragem. 2006.
180. Ferrari S, Cribari-Neto F. Beta regression for modelling rates and proportions. *Journal of Applied Statistics*. 2004;31(7):799-815.
181. Cribari-Neto F, Zeileis A. Beta regression in R. *Journal of Statistical Software*. 2009.

182. Siqueira W, Salih E, Wan D, Helmerhorst E, Oppenheim F. Proteome of human minor salivary gland secretion. *Journal of Dental Research*. 2008;87(5):445-50.
183. Helmerhorst E, Alagl A, Siqueira W, Oppenheim F. Oral fluid proteolytic effects on histatin 5 structure and function. *Archives of Oral Biology*. 2006;51(12):1061-70.
184. McManus L, Dawes P, Stringer M. Clinical anatomy of the chorda tympani: a systematic review. *The Journal of Laryngology & Otology*. 2011;125(11):1101-8.
185. Knox S, Lombaert I, Reed X, Vitale-Cross L, Gutkind J, Hoffman M. Parasympathetic innervation maintains epithelial progenitor cells during salivary organogenesis. *Science*. 2010;329(5999):1645-7.
186. Knox SM, Lombaert IM, Haddox CL, Abrams SR, Cotrim A, Wilson AJ, et al. Parasympathetic stimulation improves epithelial organ regeneration. *Nature Communications*. 2013;4:1494.
187. Leone CW, Oppenheim FG. Physical and chemical aspects of saliva as indicators of risk for dental caries in humans. *Journal of Dental Education*. 2001;65(10):1054-62.
188. Prabhakar A, Dodawad R. Evaluation of Flow Rate, pH, Buffering Capacity, Calcium, Total Protein and Total Antioxidant Levels of Saliva in Caries Free and Caries Active Children—An In Vivo Study. *International Journal of Clinical Pediatric Dentistry*. 2009;2(1):9.
189. Preethi B, Reshma D, Anand P. Evaluation of flow rate, pH, buffering capacity, calcium, total proteins and total antioxidant capacity levels of saliva in caries free and caries active children: an in vivo study. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*. 2010;25(4):425-8.
190. Kho H-S, Lee S-W, Chung S-C, Kim Y-K. Oral manifestations and salivary flow rate, pH, and buffer capacity in patients with end-stage renal disease undergoing hemodialysis. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*. 1999;88(3):316-9.
191. Gudkina J, Brinkmane A. Caries experience in relation to oral hygiene, salivary cariogenic microflora, buffer capacity and secretion rate in 6-year olds and 12 year olds in Riga. *Stomatologija*. 2008;10(2):76-80.
192. Animireddy D, Bekkem VTR, Vallala P, Kotha SB, Ankireddy S, Mohammad N. Evaluation of pH, buffering capacity, viscosity and flow rate levels of saliva in caries-free, minimal caries and nursing caries children: an in vivo study. *Contemporary Clinical Dentistry*. 2014;5(3):324.

193. Shaila M, Pai GP, Shetty P. Salivary protein concentration, flow rate, buffer capacity and pH estimation: A comparative study among young and elderly subjects, both normal and with gingivitis and periodontitis. *Journal of Indian Society of Periodontology*. 2013;17(1):42.
194. Kitasako Y, Ikeda M, Burrow MF, Tagami J. Oral health status in relation to stimulated saliva buffering capacity among Japanese adults above or below 35 years of age. *Journal of Medical and Dental Sciences*. 2006;53(4):175.
195. Fiyaz M, Ramesh A, Ramalingam K, Thomas B, Shetty S, Prakash P. Association of salivary calcium, phosphate, pH and flow rate on oral health: A study on 90 subjects. *Journal of Indian Society of Periodontology*. 2013;17(4):454.
196. Syrjälä AM, Raatikainen L, Komulainen K, Knuuttila M, Ruoppi P, Hartikainen S, et al. Salivary flow rate and periodontal infection—a study among subjects aged 75 years or older. *Oral Diseases*. 2011;17(4):387-92.
197. Vitorino R, de Moraes Guedes S, Ferreira R, Lobo MJC, Duarte J, Ferrer-Correia AJ, et al. Two-dimensional electrophoresis study of in vitro pellicle formation and dental caries susceptibility. *European Journal of Oral Sciences*. 2006;114(2):147-53.
198. Vitorino R, Lobo MJC, Duarte JR, Ferrer-Correia AJ, Domingues PM, Amado FM. The role of salivary peptides in dental caries. *Biomedical Chromatography*. 2005;19(3):214-22.
199. Klein M, Duarte S, Xiao J, Mitra S, Foster T, Koo H. Structural and molecular basis of the role of starch and sucrose in *Streptococcus mutans* biofilm development. *Applied and Environmental Microbiology*. 2009;75(3):837-41.
200. Klein MI, DeBaz L, Agidi S, Lee H, Xie G, Lin AH-M, et al. Dynamics of *Streptococcus mutans* transcriptome in response to starch and sucrose during biofilm development. *Plos One*. 2010;5(10):e13478.
201. Rucker JC, Webb BD, Frempong T, Gaspar H, Naidich TP, Jabs EW. Characterization of ocular motor deficits in congenital facial weakness: Moebius and related syndromes. *Brain*. 2014;137(4):1068-79.
202. Diamant H, Wiberg A. Does the chorda tympani in man contain secretory fibers for the parotid gland? *Acta Oto-Laryngologica*. 1965;60(1-6):255-64.
203. Reichert FL, Poth EJ. Pathways for the secretory fibers of the salivary glands in man. *Experimental Biology and Medicine*. 1933;30(7):973-7.

204. Keur I, Abraham-Inpjin L, Amerongen AN. Salivary flow rate and acute-phase proteins in Bell's palsy. *Clinical Otolaryngology & Allied Sciences*. 1994;19(5):415-21.
205. Zandian A, Osiro S, Hudson R, Ali IM, Matusz P, Tubbs SR, et al. The neurologist's dilemma: A comprehensive clinical review of Bell's palsy, with emphasis on current management trends. *International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*. 2014;20:83.
206. Garrett JR, Ekström J, Anderson LC. *Neural mechanisms of salivary gland secretion*: Karger Medical and Scientific Publishers; 1999.
207. Turner RJ, Sugiya H. Understanding salivary fluid and protein secretion. *Oral Diseases*. 2002;8(1):3-11.
208. Johnson DA. Effect of a liquid diet on the protein composition of rat parotid saliva. *The Journal of Nutrition*. 1982;112(1):175-81.
209. Wu KP, Ke J-Y, Chung C-Y, Chen C-L, Hwang T-L, Chou M-Y, et al. Relationship between unstimulated salivary flow rate and saliva composition of healthy children in Taiwan. *Chang Gung Medical Journal*. 2008;31(3):281-6.
210. Baron A, DeCarlo A, Featherstone J. Functional aspects of the human salivary cystatins in the oral environment. *Oral Diseases*. 1999;5(3):234-40.
211. Laitala-Leinonen T, Rinne R, Saukko P, Väänänen HK, Rinne A. Cystatin B as an intracellular modulator of bone resorption. *Matrix Biology*. 2006;25(3):149-57.
212. Bartold PM, Cantley MD, Haynes DR. Mechanisms and control of pathologic bone loss in periodontitis. *Periodontology 2000*. 2010;53(1):55-69.
213. Hong SW, Seo DG, Baik JE, Cho K, Yun CH, Han SH. Differential profiles of salivary proteins with affinity to *Streptococcus mutans* lipoteichoic acid in caries-free and caries-positive human subjects. *Molecular Oral Microbiology*. 2014;29(5):208-18.
214. Shaw PA, Yu W-hA. Autonomic regulation of cystatin S gene expression in rat submandibular glands. *Autonomic Neuroscience*. 2000;83(1):49-57.
215. Chaparro O, Yu W-hA, Shaw PA. Isoproterenol-induced expression of the cystatin S gene in submandibular glands of parasympathectomized rats. *Molecular brain research*. 1998;61(1):136-46.

216. Sun X, Salih E, Oppenheim FG, Helmerhorst EJ. Kinetics of histatin proteolysis in whole saliva and the effect on bioactive domains with metal-binding, antifungal, and wound-healing properties. *The FASEB Journal*. 2009;23(8):2691-701.
217. Shi Q, Jackowski G. One-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Gel electrophoresis of proteins: A practical approach*. 3a ed. Oxford: University Press. 1998:1-52.
218. Diwu Z, Haugland RP, Patton WF. Background-free, high sensitivity staining of proteins in one-and two-dimensional sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels using a luminescent ruthenium complex. *Electrophoresis*. 2000;21:2509-21.
219. Hames BD. *Gel electrophoresis of proteins: a practical approach: a practical approach*. Oxford: University Press. 1998.
220. Wilkins MR. *Proteome research: new frontiers in functional genomics*. Berlin: Springer Science & Business Media; 1997. 243 p.
221. Siqueira WL, Dawes C. The salivary proteome: challenges and perspectives. *Proteomics-Clinical Applications*. 2011;5(11-12):575-9.
222. Hu S, Loo JA, Wong DT. Human saliva proteome analysis. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2007;1098(1):323-9.
223. Washburn MP, Wolters D, Yates JR, 3rd. Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. *Nature Biotechnology*. 2001;19(3):242-7.
224. Lin D, Tabb DL, Yates JR. Large-scale protein identification using mass spectrometry. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*. 2003;1646(1):1-10.
225. Hu S, Xie Y, Ramachandran P, Ogorzalek Loo RR, Li Y, Loo JA, et al. Large-scale identification of proteins in human salivary proteome by liquid chromatography/mass spectrometry and two-dimensional gel electrophoresis-mass spectrometry. *Proteomics*. 2005;5(6):1714-28.

ANEXO A- Soluções utilizadas para o ensaio da atividade de amilase

Preparo das soluções

	C _{final}	MW
*KH ₂ PO ₄	20mM	136.09 g/mol
*NaCl	0.7mM	58.44 g/mol
Maltose	1mg/mL	360.31 g/mol
Starch	1%	162.15 g/mol
DNS	1%	228.12 g/mol

Receita do tampão:

- 0.272 g of KH₂PO₄
- 0.0041 g of NaCl
- DD water (Volume final = 50 mL)
- Adicionar a solução ácido à solução básica até atingir pH 7.0.

Receita da solução de Maltose

- 10 mg of Maltose
- DD water (Final volume = 10 mL)

Receita da solução de amido (1%)

- 0.5 g of Starch
- Água destilada (Volume final = 50 mL)

Receita da solução de DNS

- DNS 1%
- 49.5 mL of water
- NaOH 0.4M
- Potassium Sodium Tartrate 30%

APÊNDICE A- Aprovação do Comitê de Ética - FOUSP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

PARECER DE APROVAÇÃO
Protocolo 139/11
CAAE 0152.0.017.000-11

Com base em parecer de relator, o Comitê de Ética em Pesquisa **APROVOU** o protocolo de pesquisa "**Análise quantitativa e qualitativa da saliva de indivíduos com Síndrome de Möbius**", de responsabilidade da pesquisadora Maria Carolina Mussi, sob orientação da Profa. Dra. Marina Helena Cury Gallottini.

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados a este Comitê relatórios anuais referentes ao andamento da pesquisa e ao término cópia do trabalho em "cd". Qualquer emenda do projeto original deve ser apresentada a este CEP para apreciação, de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

São Paulo, 28 de março de 2012.

Profa. Dra. Marcia Turolla Wanderley
Coordenadora do CEP-FOUSP

APÊNDICE B- Termo de consentimento livre e esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO **Dados de identificação**

Título do Projeto: Características da saliva produzida pela parótida e a relação com

índice de cárie e doença periodontal em indivíduos com síndrome de Moebius

Pesquisadores: Maria Carolina Martins Mussi (CROSP 95380) e Gabrielle Oliveira

Pesquisador Responsável: Marina Helena Cury Gallottini (CROSP 34881)

Instituição a que pertence o Pesquisador Responsável: Universidade de São Paulo (FOUSP)

O estudo será realizado no Centro de Atendimento a Pacientes Especiais da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Telefones para contato: (11) 8766-6140 - (11) 3091-7894

Nome do voluntário: _____

Idade: _____ anos

R.G. _____

Responsável legal (se necessário): _____

R.G. Responsável legal: _____

O Sr. (ª) está sendo convidado(a) a participar do projeto de pesquisa “Características da saliva produzida pela parótida e a relação com índice de cárie e doença periodontal em indivíduos com síndrome de Moebius”, desenvolvido pelas alunas Maria Carolina Martins Mussi e Gabrielle Oliveira, sob orientação da Profa. Dra. Marina Helena Cury Gallottini.

O presente trabalho visa avaliar algumas características da saliva que podem estar associadas ao aparecimento de lesões de cárie em pacientes com Síndrome de Möbius e compará-las as características encontradas na saliva de pacientes que não apresentam a síndrome. Esse trabalho visa melhor entendimento acerca da composição salivar desses pacientes, visando, no futuro, um melhor direcionamento do tratamento odontológico.

Assim, benefícios ao paciente e futuros benefícios a ele e a população em geral podem advir da melhora dos serviços odontológicos a serem prestados, baseados nas suas condições e necessidades especiais. Os riscos ou desconfortos serão mínimos, já que o questionário e o exame bucal são parte dos cuidados a serem tomados com estes pacientes. A coleta e avaliação dos pacientes serão realizadas em uma única sessão com tempo médio de uma hora. As amostras salivares obtidas serão armazenadas para pesquisas futuras

Os pacientes que concordarem em participar da pesquisa serão avaliados em relação ao acometimento pela síndrome de Möbius, mediante a alguns exercícios mímicos e sensitivos. Serão também coletados, sob leve sucção, 2 ml de saliva total sem estímulo e a saliva estimulada de origem na glândula parótida, durante um período de 5 minutos. A identificação do paciente será preservada de forma que seu nome e dados pessoais não aparecerão nas publicações subseqüentes à pesquisa nem serão citados em cursos, palestras ou aulas expositivas. O paciente não receberá e não efetuará nenhum pagamento pela sua participação na pesquisa ou pelo atendimento prestado.

Você poderá ter todas as informações que quiser sobre a pesquisa. Fica claro que o paciente terá o direito de não aceitar participar da pesquisa ou de retirar o consentimento cedido a qualquer momento, sem prejuízo de qualquer benefício que esteja recebendo.

Em relação ao armazenamento das amostras de saliva obtidas, devido à escassez de trabalhos com saliva de pacientes com Möbius e a baixa incidência dessa síndrome na população, temos a intenção de realizar novos estudos com essas amostras, de maneira que possam contribuir para melhor conhecimento das características bucais específicas deste grupo de pacientes. Os tipos de informação que poderão ser obtidos nas pesquisas futuras, a partir da utilização da amostra de saliva armazenada, envolvem alterações na saliva associadas ao alto índice de cárie descrito na literatura nos indivíduos com síndrome de Möbius, ou qualquer outra alteração salivar que possa ser relacionada à saúde bucal e geral desses indivíduos.

Os pesquisadores declaram que toda nova pesquisa a ser realizada com o material armazenado será submetida para aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) institucional e, quando for o caso, da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP).

O consentimento livre e esclarecido referente à coleta, depósito, armazenamento e utilização da saliva em Biorrepositório é formalizada através deste termo de consentimento, onde o paciente deve manifestar sua opinião com relação à sua vontade de permitir que o material seja armazenado para uso futuro ou não, assinalando com um x apenas uma das alternativas:

- () necessidade de novo consentimento a cada pesquisa;
- () dispensa de novo consentimento a cada pesquisa;
- () não permito o armazenamento da saliva em Biobanco

O paciente envolvido na pesquisa ou seu responsável legal tem acesso ao conhecimento de todos os resultados, bem com as suas respectivas implicações, obtidos a partir da utilização de sua amostra de saliva. Todos os dados fornecidos, coletados e obtidos a partir desta pesquisa poderão ser utilizados para pesquisas futuras.

O descarte das amostras de saliva armazenadas no Biorrepositório, ou sua transferência, será comunicada ao sujeito da pesquisa. O descarte da amostra de saliva pode ocorrer devido à retirada do consentimento do sujeito, inadequação da amostra por critérios de qualidade, iniciativa da instituição e pela dissolução do Biorrepositório. Se você preferir, podemos informar caso seja necessário o descarte da(s) amostra(s) referente ao seu material

As amostras de saliva serão armazenadas com inibidor de protease, em tubos de 1,5ml, em freezer - 80°C e são do paciente, permanecendo armazenadas no Departamento de Patologia Bucal (FOUSP) sob a responsabilidade da Profa.Dra. Marina Helena Cury Gallottini. O paciente, ou seu representante legal, a qualquer momento e sem qualquer prejuízo, pode retirar o consentimento de guarda e utilização das amostras de saliva armazenadas. A retirada do consentimento será formalizada por manifestação por escrito e assinada pelo sujeito da pesquisa ou seu representante legal.

Em qualquer momento durante o andamento do estudo as pesquisadoras alunas Maria Carolina Martins Mussi e Gabrielle Oliveira estarão disponíveis para dúvidas ou esclarecimentos pelos telefones 3091-7859 ou 3091-7838.

Se houver dúvidas sobre a ética da pesquisa entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia (Av. Lineu Prestes 2227, 05508-000 São Paulo ou pelo e-mail cepfo@usp.br).

Eu, _____, RG nº _____, após ter sido informado e ter minhas dúvidas suficientemente esclarecidas pelo pesquisador concordo em participar de forma voluntária desta pesquisa descrita acima.

ou

Eu, _____, RG nº _____, responsável legal por
_____, RG nº _____ após ter sido informado e ter minhas dúvidas
suficientemente esclarecidas pelo pesquisador concordo em participar de forma voluntária desta pesquisa descrita
acima.

São Paulo, ____ de _____ de 201____

Nome e assinatura do paciente ou seu responsável legal

Nome, assinatura e CRO ou documento relacionado do pesquisador

Nome, assinatura e CRO ou documento relacionado do orientador responsável pelo estudo

Nome e assinatura de testemunha

Este documento é feito em duas vias: uma via fica com o investigador e a outra fica com o participante.

APÊNDICE C - Folha de testes para avaliação da capacidade motora e sensitiva de indivíduos com síndrome de Moebius

PAR CRANIANO TESTATO	AVALIAÇÃO CLÍNICA	DEVE-SE OBSERVAR	TOTAL	PARCIAL (LADO)	NORMAL
Ramo temporal do VII	Enrugar a testa (levantando a sobrancelha)	Enrugamento da testa (simetria)			
Ramo zigomático do VII	Fechar os olhos bem apertados	Se houver acometimento, nota-se sinal de Bell do lado acometido (globo ocular para cima e para fora).			
Ramos bucais do VII	Riso forçado	Alteração da rima bucal pela ausência de movimento no lado comprometido			
Ramos bucais do VII	Pressione os lábios com firmeza	Dificuldade de separar os lábios do paciente			
Ramo mandibular do VII	Tracionar o ângulo da boca para baixo
Ramo mandibular do VII	Tracionar o lábio inferior para baixo
Ramo mandibular do VII	Protrusão do lábio inferior e enrugamento da pele do mento
Ramo cervical do VII	Contração do platisma, apertar a mandíbula (morder com muita força)	Enrugamento do pescoço			
Par craniano VI	Observar paciente em repouso frontalmente	Estrabismo convergente			
Par craniano IV	Movimento do olho no sentido inferior (infraversão) e no sentido medial concomitantemente
Par craniano III	Pedir ao paciente para olhar para o lado direito e esquerdo e observa-se o bulbo que se desloca para o lado medial
Par craniano III	Pedir ao paciente para olhar para cima	Observar o paciente deslocar o olho para cima			
Par craniano III	Pedir ao paciente para olhar para baixo	Observar o paciente deslocar o olho para baixo			
Par craniano III	Observar a abertura palpebral espontânea	Observar se há ptose e se é bi ou unilateral			
Par craniano II	Colocar um feixe de luz direto em uma das duas pupilas e ver se as duas contraem. Fazer dos dois lados	As duas pupilas devem contrair. Anotar o lado do feixe e o lado da pupila que não contraiu em resposta ao estímulo (ex. feixe a direita, pupila oposta sem contração)			
Par craniano XII	Pedir ao paciente para colocar a língua para fora da boca (protrusão da língua)	A observação de desvio indica que o lado do desvio é o lado afetado pela paralisia muscular. A paralisia bilateral causa impossibilidade de protrusão da língua			
Par craniano V	Passar um cotonete resfriado na região próxima à linha média. Fazer em ambos os lados. Paciente com olho fechado	Observar se há sensibilidade do paciente			
Par craniano V	Tocar suavemente a pele com um rolete de algodão, na região próxima à linha média. Fazer em ambos os lados. Paciente com olho fechado	Observar se há sensibilidade do paciente			
Par craniano V	Pedir para o paciente morder o mais forte possível	Se o paciente não conseguir morder a ausência da função. Se o paciente conseguir morder com força, deve-se palpar os músculos masseter e temporal			
Par craniano V	Pedir ao paciente para abrir a boca e olhar se há desvio da mandíbula	Se o componente motor não está funcionando corretamente, a mandíbula irá desviar para o lado fraco			
Par craniano V	Pedir ao paciente para mover a mandíbula para um lado enquanto e tentar empurrá-la de volta para a posição mediana	O examinador deve não ser capaz de superar a força dos músculos pterigóideo. Fazer dos dois lados.			
Par craniano V	Tocar no meio do queixo com um martelo, enquanto a boca do paciente encontra-se ligeiramente aberta	Um súbito fechamento da mandíbula constitui um reflexo normal.			
Par craniano XI	Levantar os ombros	Levantamento dos ombros			

APÊNDICE D - Valores descritos, por paciente com SM, das análises realizadas.

SIGLA	VII	Lado com VII mais acometido	VI	IV	III	II	XII	V	XI	Soma	Lado total mais acometido	PSR	Índice de placa	NE (ml/min)	SE (ml/min)	PD (ml/min)	PE (ml/min)
M1	1	E	1	0	0,25	0	1	0,2	0	3,45	E	0	0,79	0,305	0,9	0,2	0,25
M2	0,875	E	1	4	1,5	0	1	0,6	1	9,975	E	1	1,58	0,4	0,5	0,56	0,3
M3	2,25	DE	4	4	1,25	0	1	0	0	12,5	DE	2	2	0,21	0,4	0,68	0,19
M4	2,625	D	3	4	1	0	2	0,4	0	13,025	DE	1	1,75	0,13	0,38	0,09	0
M5	0,5	D	2	1	0,25	0	0	0,4	0	4,15	D	1	0,54	0,125	0,31	0	0,32
M6	3,25	DE	1	2	1,5	0	1	0,8	2	11,55	D	1	0,66	0,036	0,19		
M7	3,125	D	2	4	1,5	0	1	0,2	0	11,825	D	2	1,41	0	0,75	0	0
M8	1,875	E	0	3	1	1	1	0,4	0	8,275	E	1	0,875	0,06	0,24	0,1	0,5
M9	2,375	E	1	1	0,25	0	1	0	0	5,625	E	3	0,16	0,38	0,052	0	0
M10	1	DE	3	2	0,5	0	1	0	0	7,5	E	3	0,33	0,25	0,175	0	0,07
M11	3,625	D	1	4	1,5	0	0	0,4	1	11,525	D	3	1,5	0,014	0,6	0	0
M12	3,125	D	2	4	1	0	1	0	0	11,125	D	1	0,66	0,12	1	0,16	0,15
M13	2,75	E	1	3	1,25	0	4	0	0	12	E	0	1,41	0,05	0,21		
M14	3,25	E	1	3	1	0	2	1,2	0	11,45	E	0	0,375	0,15	0,55	0,15	0
M15	0,375	E	1	2	0,75	0	0	0,2	0	4,325	E	0	0,79	0,3	0,53	0	0

PSR (Periodontal Screening And Recording), NE (saliva não estimulada), SE (saliva estimulada), PD e PE (saliva parotídea direita e esquerda)

APÊNDICE E - Dispersão dois a dois e coeficiente de correlação de Pearson entre os Cortes do ICDAS

APÊNDICE F - Tabela graduando o acometimento facial de acordo com o nervo envolvido (nervos VII, VI, IV, III, II, XII, V, XI) e lado mais acometido

SIGLA	VII	VI	IV	III	II	XII	V	XI	Soma	Lado total mais acometido
M1	1	1	0	0,25	0	1	0,2	0	3,5	E
M2	0,88	1	4	1,5	0	1	0,6	1	10,0	E
M3	2,25	4	4	1,25	0	1	0,0	0	12,5	DE
M4	2,63	3	4	1	0	2	0,4	0	13,0	DE
M5	0,50	2	1	0,25	0	0	0,4	0	4,2	D
M6	3,25	1	2	1,5	0	1	0,8	2	11,6	D
M7	3,13	2	4	1,5	0	1	0,2	0	11,8	D
M8	1,88	0*	3	1	1	1	0,4	0	8,3	E
M9	2,38	1	1	0,25	0	1	0,0	0	5,6	E
M10	1	3	2	0,5	0	1	0,0	0	7,5	E
M11	3,63	1	4	1,5	0	0	0,4	1	11,5	D
M12	3,13	2	4	1	0	1	0,0	0	11,1	D
M13	2,75	1	3	1,25	0	4	0,0	0	12,0	E
M14	3,25	1	3	1	0	2	1,2	0	11,5	E
M15	0,38	1	2	0,75	0	0	0,2	0	4,3	E

*paciente com cirurgia para correção de estrabismo

APÊNDICE G - Gráficos preditos auxiliares relativos aos cortes 3,4 e 5 de ICDAS

Valores preditos para o Corte 3 do ICDAS segundo NE (ml/min) e Grupo, fixando PE em 0,3 ml/min

Valores preditos para o Corte 4 do ICDAS segundo NE (ml/min) e Grupo, fixando PE em 0,3 ml/min

Valores preditos para o Corte 5 do ICDAS segundo NE (ml/min) e Grupo, fixando PE em 0,3 ml/min

APÊNDICE H - Modelos para o corte do ICDAS segundo Grupo, saliva não estimulada e parotídea esquerda

Resposta	Coefficientes	Estimativa	Erro padrão	valor p
Corte 1 ICDAS (prop.)	Intercepto	0,325	0,911	0,721
	Grupo (Moebius)	0,48	1,149	0,676
	NE (cl/min)	-0,116	0,098	0,238
	PE (cl/min)	-0,077	0,193	0,691
	Grupo (Moebius) : NE (cl/min)	-0,701	0,292	0,016
	Grupo (Moebius) : PE (cl/min)	0,383	0,293	0,192
	ϕ (parâmetro de dispersão)	1,233	0,31	<0,001
Corte 2 ICDAS (prop.)	Intercepto	-0,632	0,863	0,464
	Grupo (Moebius)	2,43	1,118	0,03
	NE (cl/min)	0,044	0,093	0,636
	PE (cl/min)	-0,261	0,181	0,15
	Grupo (Moebius) : NE (cl/min)	-0,978	0,294	0,001
	Grupo (Moebius) : PE (cl/min)	0,291	0,28	0,299
	ϕ (parâmetro de dispersão)	1,648	0,447	<0,001
Corte 3 ICDAS (prop.)	Intercepto	-1,305	0,677	0,054
	Grupo (Moebius)	-0,073	0,811	0,928
	NE (cl/min)	-0,033	0,077	0,663
	PE (cl/min)	-0,417	0,152	0,006
	Grupo (Moebius): NE (cl/min)	-0,479	0,221	0,03
	Grupo (Moebius): PE (cl/min)	0,302	0,222	0,174
	ϕ (parâmetro de dispersão)	9,278	3,105	0,003
Corte 4 ICDAS (prop.)	Intercepto	-4,177	0,799	<0,001
	Grupo (Moebius)	2,486	0,868	0,004
	NE (cl/min)	-0,005	0,081	0,946
	PE (cl/min)	-0,071	0,159	0,655
	Grupo (Moebius): NE (cl/min)	-0,454	0,21	0,031
	Grupo (Moebius): PE (cl/min)	-0,438	0,235	0,062
	ϕ (parâmetro de dispersão)	18,903	7,539	0,012
Corte 5 ICDAS (prop.)	Intercepto	-4,159	0,81	<0,001
	Grupo (Moebius)	1,933	0,886	0,029
	NE (cl/min)	-0,023	0,081	0,78
	PE (cl/min)	-0,084	0,159	0,599
	Grupo (Moebius): NE (cl/min)	-0,753	0,23	0,001
	Grupo (Moebius): PE (cl/min)	-0,169	0,236	0,473
	ϕ (parâmetro de dispersão)	19,734	8,579	0,021

APÊNDICE I - Proteínas com razão de abundância (>1,25 ou < 0,75) para o cruzamento entre os grupos

Razão entre os grupos	Número de acesso da proteína	Nome da proteína	Número de peptídeos	Valor da razão	pValor	Principal função*
G1/G2	Q9UF83	Uncharacterized protein DKFZp434B061	41	0,48	0,017	Componente celular
	H7BYZ0	Mucin 5B	17	0,59	0,005	Lubrificação e antimicrobiano
	P12273	Prolactin inducible protein	5	0,60	0,001	Interação proteína/proteína
	G3CIG0	MUC19 variant 12	58	0,62	0,001	Lubrificação
	P01833	Polymeric immunoglobulin receptor	10	0,64	0,007	Transporte
	P07737	Profilin 1	3	0,68	0,003	Interação proteína/proteína
	C3PTT6	Pancreatic adenocarcinoma upregulated factor	4	0,69	0,044	Angiogênese
	P04080	Cystatin B	3	0,70	0,001	Metabolismo
G3/G4	Q8NDH2	HUMAN Coiled coil domain containing protein 168	5	1,29	0,001	Desconhecida
	Q96AY4	HUMAN Tetratricopeptide repeat protein 28	8	1,31	0,001	Divisão celular
	F8WBW8	HUMAN BAH and coiled coil domain containing protein 1	7	1,31	0,007	Ligação à cromatina
	Q5SZK8	HUMAN FRAS1 related extracellular matrix protein 2	6	1,45	0,001	Metabolismo
	P20930	HUMAN Filaggrin	18	1,47	0,001	Agregação de queratina
	E9PAV3	HUMAN Nascent polypeptide associated complex subunit alpha	8	1,56	0,001	Regulação da transcrição
	P49792	HUMAN E3 SUMO protein ligase RanBP2	6	1,62	0,001	Transporte
						continua

						continuação
G5/G6	P12273	HUMAN Prolactin inducible protein	4	1,65	0,001	Interação proteína/proteína
	Q96DR5	HUMAN BPI fold containing family A member 2	3	1,71	0,001	Antimicrobiana
	A8K739	HUMAN cDNA FLJ77339	6	1,70	0,001	Interação com lipídeos
G7/G8	P12273	HUMAN Prolactin inducible protein	4	1,81	0,001	Interação proteína/proteína
G12/G11	P04080	HUMAN Cystatin B	3	1,60	0,020	Metabolismo
	P01034	HUMAN Cystatin C	3	0,10	0,001	Antimicrobiano
	B5ME49	HUMAN Mucin 16	95	0,50	0,001	Lubrificação e proteção
	A8K5R2	HUMAN cDNA FLJ77293 highly similar to Homo sapiens vasohibin 1 (VASH1) mRNA	4	0,53	0,001	Angiogênese
	Q5SYE7	HUMAN NHS like protein 1	28	0,55	0,001	Estrutural
	Q96DR5	HUMAN BPI fold containing family A member 2	3	0,56	0,002	Antimicrobiana
	C3PTT6	HUMAN Pancreatic adenocarcinoma upregulated factor	6	0,57	0,001	Angiogênese
	P04080	HUMAN Cystatin B	4	0,59	0,001	Metabolismo
	P01037	HUMAN Cystatin SN	2	0,60	0,001	Metabolismo
	P12273	HUMAN Prolactin inducible protein	7	0,63	0,001	Interação proteína/proteína
	H7BYZ0	HUMAN Mucin 5B	11	0,64	0,001	Lubrificação e antimicrobiana
	A1L447	HUMAN Ubiquitin carboxyl terminal hydrolase	6	0,67	0,001	Metabolismo
G13/G14	P01833	HUMAN Polymeric immunoglobulin receptor	7	1,29	0,001	Transporte
continua						

continuação					
B4DYX1	HUMAN cDNA FLJ57672 highly similar to Homo sapiens MORC family CW type zinc finger 1 (MORC1) mRNA	6	0,23	0,006	Diferenciação celular
Q5T1R4	HUMAN Transcription factor HIVEP3	5	0,24	0,001	Diferenciação celular
Q8NDH2	HUMAN Coiled coil domain containing protein 168	4	0,38	0,017	Desconhecida
P01833	HUMAN Polymeric immunoglobulin receptor	9	0,46	0,001	Transporte
Q8NFC6	HUMAN Biorientation of chromosomes in cell division protein 1 like	16	0,47	0,001	Divisão celular
B7Z421	HUMAN cDNA FLJ51227 highly similar to Homo sapiens KIN antigenic determinant of recA protein homolog mRNA	24	0,56	0,001	Desconhecida
Q6AWC2	HUMAN Protein WWC2	6	0,57	0,001	Metabolismo
Q5JV73	HUMAN FERM and PDZ domain containing protein 3	8	0,64	0,001	Componente celular
B7ZLX3	HUMAN CLASP1 protein	18	0,64	0,001	Divisão celular
Q8IVF2	HUMAN Protein AHNAK2	8	0,65	0,001	Interação proteína/proteína
Q9NR48	HUMAN Histone lysine N methyltransferase ASH1L	7	0,67	0,001	Sinalização celular
C9J908	HUMAN Uncharacterized protein	4	0,67	0,003	Desconhecida
A6NKC6	HUMAN Retinitis pigmentosa 1 like 1 protein	13	0,68	0,001	Sinalização celular
E9PAV3	HUMAN Nascent polypeptide associated complex subunit alpha	6	0,71	0,019	Regulação da transcrição
B4DR76	HUMAN Eukaryotic translation initiation factor 4E transporter	5	0,72	0,003	Metabolismo
Q5CZC0	HUMAN Fibrous sheath interacting protein 2	7	0,73	0,001	Desconhecida
Q12830	HUMAN Nucleosome remodeling factor subunit BPTF	13	0,75	0,001	Regulação de transcrição
continua					

						continuação
G9/G1	Q8N9E0	HUMAN Protein FAM133A	11	0,75	0,001	Interação proteína/proteína
	E9PAV3	HUMAN Nascent polypeptide associated complex subunit alpha	5	1,36	0,001	Regulação da transcrição
	B2R7Z6	HUMAN cDNA FLJ93674	14	1,48	0,001	Interação com lipídeos
	P98088	MUC5A HUMAN Mucin 5AC (Fragments)	35	1,58	0,001	Lubrificação e proteção
	P01833	HUMAN Polymeric immunoglobulin receptor	6	1,59	0,001	Transporte
	Q9NR48	HUMAN Histone lysine N methyltransferase ASH1L	3	1,66	0,001	Sinalização celular
	Q5CZC0	HUMAN Fibrous sheath interacting protein 2	13	1,78	0,001	Desconhecida
	Q08378	HUMAN Golgin subfamily A member 3	12	1,85	0,001	Transporte
	Q96DR5	HUMAN BPI fold containing family A member 2	3	1,87	0,001	Antimicrobiana
	Q12955	HUMAN Ankyrin 3	16	1,94	0,001	Metabolismo
	P04080	HUMAN Cystatin B	3	1,94	0,001	Metabolismo
	P12273	HUMAN Prolactin inducible protein	6	2,22	0,001	Interação proteína/proteína
	P01036	HUMAN Cystatin S	5	2,62	0,001	Metabolismo
	C3PTT6	HUMAN Pancreatic adenocarcinoma upregulated factor	5	2,62	0,001	Angiogênese
	P01037	HUMAN Cystatin SN	2	2,99	0,001	Metabolismo
G2/G10	Q9P206	HUMAN Uncharacterized protein KIAA1522	16	0,35	0,001	Desconhecida
	P01037	HUMAN Cystatin SN	2	0,37	0,001	Metabolismo
	C3PTT6	HUMAN Pancreatic adenocarcinoma upregulated factor	6	0,43	0,001	Angiogênese
	P01036	HUMAN Cystatin S	5	0,47	0,001	Metabolismo

continua

continuação						
G3/G11	B3KW15	HUMAN cDNA FLJ43124 fis clone CTONG3004072 highly similar to Protein EMSY	6	0,53	0,025	Desconhecida
	Q96JH7	HUMAN Deubiquitinating protein VCIP135	3	0,57	0,004	Metabolismo
	P12273	HUMAN Prolactin inducible protein	4	0,57	0,001	Interação proteína/proteína
	P01833	HUMAN Polymeric immunoglobulin receptor	10	0,73	0,001	Transporte
	P32926	HUMAN Desmoglein 3	3	0,74	0,010	Adesão celular
	C3PTT6	HUMAN Pancreatic adenocarcinoma upregulated factor	6	0,55	0,001	Angiogênese
	Q5D862	HUMAN Filaggrin 2	19	0,63	0,001	Estrutural molecular
	B4E209	HUMAN cDNA FLJ53463 highly similar to Bactericidal/permeability increasing protein like 1	4	1,30	0,001	Interação com lipídeos
	P01833	HUMAN Polymeric immunoglobulin receptor	7	1,31	0,001	Transporte
	H7BYZ0	HUMAN Mucin 5B	9	1,33	0,001	Lubrificação e antimicrobiana
	E9PAV3	HUMAN Nascent polypeptide associated complex subunit alpha	18	1,34	0,001	Regulação da transcrição
	B7Z9A6	HUMAN N sulphoglucosamine sulphohydrolase	5	1,39	0,001	Metabolismo
	A8K5R2	HUMAN cDNA FLJ77293 highly similar to Homo sapiens vasohibin 1 (VASH1) mRNA	4	1,41	0,001	Angiogênese
	P20930	HUMAN Filaggrin	13	1,43	0,001	Agregação de queratina
	G3CIG0	HUMAN MUC19 variant 12	44	1,45	0,001	Lubrificação
	Q96DR5	HUMAN BPI fold containing family A member 2	3	1,48	0,001	Antimicrobiana
	B4E223	HUMAN cDNA FLJ52075 moderately similar to Mus musculus SPT2 Suppressor of Ty domain containing 1 mRNA	3	1,79	0,001	Desconhecida
G5/G13						
continua						

						continuação
	Q9UF83	HUMAN Uncharacterized protein DKFZp434B061	17	0,26	0,001	Componente celular
G6/G14	Q9NV58	HUMAN E3 ubiquitin protein ligase RNF19A	10	0,10	0,001	Componente celular
	B4E392	HUMAN cDNA FLJ52602 highly similar to Pinin	25	0,14	0,001	Desconhecida
	Q9NR48	HUMAN Histone lysine N methyltransferase ASH1L	7	0,18	0,001	Sinalização celular
	P20930	HUMAN Filaggrin	9	0,27	0,001	Agregação de queratina
	A8K5R2	HUMAN cDNA FLJ77293 highly similar to Homo sapiens vasohibin 1 (VASH1) mRNA	4	0,29	0,001	Angiogênese
	G3CIG0	HUMAN MUC19 variant 12	108	0,30	0,001	Lubrificação
	P01833	HUMAN Polymeric immunoglobulin receptor	9	0,55	0,001	Transporte
	P12273	HUMAN Prolactin inducible protein	3	0,59	0,001	Interação proteína/proteína
G7/G15	B2RU27	HUMAN Testis expressed 15	9	0,16	0,001	Homeostase
	G3CIG0	HUMAN MUC19 variant 12	29	0,17	0,001	Lubrificação
	P01833	HUMAN Polymeric immunoglobulin receptor	7	0,49	0,001	Transporte
	P02812	HUMAN Basic salivary proline rich protein 2	2	1,26	0,001	Resposta imune
	P12273	HUMAN Prolactin inducible protein	3	1,39	0,001	Interação proteína/proteína
	E9PH94	HUMAN Uncharacterized protein C5orf42	3	1,52	0,001	Desconhecida
	H0Y4T4	HUMAN Centrosomal protein of 170 kDa (Fragment)	8	1,55	0,001	Componente celular
G8/G16		HUMAN Uncharacterized protein				Componente
	Q9UF83	DKFZp434B061	14	0,60	0,001	celular
	Q96Q06	HUMAN Perilipin 4	8	1,34	0,045	Metabolismo

continua

					conclusão
					Componente celular e regula sinalização
Q5T4S7	HUMAN E3 ubiquitin protein ligase UBR4	18	1,45	0,002	

*Os dados referentes às principais funções das proteínas foram retirados dos bancos de dados: Uniprot e Protein Information Resource (PIR)