LUCIANA MOREIRA LIMA SAFIOTI

**COMPARAÇÃO DOS NÍVEIS DE HISTATINAS DA SALIVA DA
PARÓTIDA ENTRE SUJEITOS COM DOENÇA PERIODONTAL E
SUJEITOS SEM HISTÓRIA PRÉVIA DE DOENÇA PERIODONTAL**

São Paulo

2005

Luciana Moreira Lima Safioti

**Comparação dos níveis de histatinas da saliva da parótida entre
sujeitos com doença periodontal e sujeitos sem história prévia de
doença periodontal**

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

Área de Concentração: Periodontia

Orientador:
Prof. Dr. Roberto Fraga Moreira Lotufo

São Paulo

2005

FOLHA DE APROVAÇÃO

Safioti LML. Comparação dos níveis de histatinas da saliva da parótida entre sujeitos com doença periodontal e sujeitos sem história prévia de doença periodontal. [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2005.

São Paulo,   /   /

Banca Examinadora

1) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

2) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

3) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

A vocês, amados Pai e Mãe, Ben-hur e Consolação,
Por me concederem a vida,
Pela educação e formação que me proporcionaram,
Pelo exemplo de garra e crescimento que demonstraram durante suas vidas,
Pela significativa e gostosa apreciação que herdei pelas coisas simples,
Pelo ambiente alegre e saudável em que vivi,
Por me presentear com meus amados irmãos Marcelo e Cláudia,
Pelo relacionamento de amor e amizade que todos temos até hoje,
Dedico a vocês dois as minhas alegrias e conquistas; vocês são os donos de tudo.

A você, Érico,
Por dez anos de intenso amor e dedicação,
Por desfrutarmos juntos uma vida de surpresas e conquistas,
Por encararmos fortes e sem medo os desafios,
Por nos apoiarmos e caminharmos sempre na mesma direção,
Pelas risadas que damos por não sabermos qual é a direção,
Por tudo o que você me ensinou e por tudo o que aprendemos juntos,
Por eu me sentir feliz e segura por ser sua.
Agradeço pelo que já passamos. Ao que virá? Sim!

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao meu orientador Prof. Dr. Roberto Lotufo, Professor Associado da Disciplina de Periodontia da FOU SP, por sua confiança, incessante estímulo e pronta dedicação à distância com todos os passos necessários para a orientação deste trabalho. Agradeço por todos os e-mails rapidamente respondidos e dúvidas esclarecidas. Agradeço também pela atenção e aprendizado proporcionados durante as partes clínica e teórica do Curso de Pós-Graduação em Periodontia da FOU SP.

À Dra. Bianca Flora, Professora Assistente da Disciplina de Periodontia da Nova Southeastern University, Fort Lauderdale, Flórida e Investigadora Principal neste Projeto de Pesquisa. Agradeço por ter me recebido muito bem na universidade, pela oportunidade que me concedeu de participar neste projeto como Co-investigadora, por ter compartilhado seu vasto conhecimento e experiência neste assunto e por toda a sua ajuda e dedicação na parte experimental do trabalho.

À querida amiga Dra. Ana Karina Andrade, Mestra pela FOU SP, com quem durante todo o curso de mestrado compartilhei e até hoje compartilho valiosas conversas e muita confiança. Tenho nossa amizade como um exemplo de como a distância dificulta mas não acaba com relacionamentos saudáveis e verdadeiros. Receba meu imensurável agradecimento por você ter oferecido e dedicado seu precioso tempo e ajuda para os procedimentos de correção, encadernação e entrega desta dissertação.

AGRADECIMENTOS

Aos Professores da Disciplina de Periodontia da FOUSP: Francisco Emílio Pustiglioni, Roberto Fraga Moreira Lotufo, Giorgio De Micheli, Cesário Antônio Duarte, Luiz Antônio Pugliesi Alves de Lima, Koto Nakae, Marco Antônio Paupério Georgetti, Rosana Gerab Tramontina, Sílvia Rosana Soares Carneiro e Giuseppe Alexandre Romito, por terem participado na evolução do meu conhecimento em Periodontia durante os cursos de Graduação e Pós-Graduação e por seu apoio e amizade.

Aos Professores da Disciplina de Periodontia diretamente envolvidos no Curso de Pós-Graduação da FOUSP: Francisco Emílio Pustiglioni, Roberto Fraga Moreira Lotufo, Giorgio De Micheli, Luiz Antônio Pugliesi Alves de Lima, Giuseppe Alexandre Romito e Ana Vitória Imbronito pelo excelente curso desenvolvido e a incansável dedicação ao aprendizado dos alunos nos seminários e na clínica.

Aos colegas do Curso de Pós-Graduação em Periodontia da FOUSP: Ana Karina Andrade, Arianne Rodrigues, Carlos Bernardo, Christiane Yorioka, Débora Garcia, Fernando Soares, Fernando Hayashi, Gláucia Zimmermann, Juliana Ganhito, Karla Kantorski, Nívea Freitas, Paula Varela, pelos conhecimentos, conversas, risadas e bons momentos compartilhados durante o curso.

Às colegas de Pós-Graduação Christiane Yorioka, Juliana Ganhito e Débora Garcia pela amizade e boas conversas compartilhadas.

Aos Doutores, Mestres e Pós-graduandos pela amizade e tempo de convivência no Departamento de Periodontia da FOU SP: Marina Conde, Ilíria Feist, Ana Vitória Imbronito, Renata Penteado, Luciana Saraiva, Alessandra Ferraro, Eliane Matsura, Nelson Gnoatto, Dácio Pântano Jr., Cláudio Panutti, Cássio Carvalho Jr., Ricardo Takiy.

Às secretárias da Disciplina de Periodontia da FOU SP Márcia, Mara e Simone pela cordial ajuda durante minha vida na USP e pela pronta disposição e atenção que me forneceram via telefone ou e-mail para a realização desta dissertação.

A Catia Tiezzi dos Santos, Chefe do Serviço de Pós-Graduação da FOU SP, pela extraordinária atenção, profissionalismo e carinho com que trata todos nós. Agradeço imensamente por toda sua dedicação, paciência e por todos os e-mails pessoais respondidos com detalhes e sempre positivos e encorajadores.

A Nair, do Serviço de Pós-Graduação da FOU SP, por sua atenção e ajuda.

Aos funcionários da Biblioteca da FOU SP pela correção e formatação desta dissertação.

À minha querida amiga Profa. Dra. Rosana Tramontina pela convivência sempre alegre, fértil e recompensadora que tivemos, inicialmente como minha professora no curso de Graduação, posteriormente eu como estagiária e ela como professora na clínica de graduação da Disciplina de Periodontia e, mais tarde, como colegas de consultório, o que me proporcionou conhecimento nas áreas de Periodontia e

Prótese. Sou eternamente grata pela experiência profissional e pela amizade sincera que compartilhamos. Tenho você como um exemplo forte de uma mulher-esposa-mãe-profissional de sucesso no curso da vida de uma mulher.

Ao querido amigo Prof. Mestre José Eduardo Baronto Marinho pela amizade presente até hoje e convivência enquanto colegas da Disciplina de Periodontia e pelo aprendizado e exemplo de profissionalismo enquanto colegas de consultório. Sou eternamente grata pela oportunidade de trabalho em seu consultório nos primeiros anos de minha vida profissional, o que me proporcionou conhecimento nas áreas de Periodontia e Cirurgia Oral Menor.

Ao querido Prof. Dr. Gilson Tristão pela convivência enquanto colegas da Disciplina de Periodontia e pela oportunidade de trabalho em seu consultório por um período da minha vida profissional que me proporcionou conhecimento nas áreas de Periodontia e Prótese.

Ao querido Prof. Dr. Luis Armando Chambrone pela convivência e aprendizado proporcionados durante meu Curso de Especialização em Periodontia brilhantemente coordenado por ele e colaboradores na Universidade Metodista de São Paulo, São Bernardo do Campo, SP.

A Profa. Dra. Ana Vitória Imbronito pela oportunidade de trabalho como professora no Curso de Especialização em Periodontia brilhantemente coordenado por ela na Associação Paulista de Cirurgiões Dentistas, Regional de São Caetano do Sul, SP.

Ao Prof. Dr. Clark Galin, Chefe do Departamento de Periodontia da Faculdade de Odontologia da Nova Southeastern University por sua confiança e pela oportunidade de crescimento pessoal e profissional a mim concedida como Professora Assistente no Curso de Graduação do Departamento de Periodontia.

Ao Prof. Dr. Arthur DeCarlo, Chefe do Laboratório de Pesquisa da Nova Southeastern University, pelo uso do seu laboratório para este projeto.

Ao Dr. Adel Alagl do Departamento de Periodontia e Biologia Bucal da Faculdade de Odontologia da Boston University, Massachusetts, pela quantificação das histatinas por cromatografia líquida de alta pressão.

Aos pacientes da Nova Southeastern University envolvidos na pesquisa, por sua disponibilidade, confiança e colaboração.

Ao Prof. Dr. Gabriel Suciu, Divisão de Saúde Pública, Nova Southeastern University, pela análise e interpretação estatística.

À Divisão de Profissões da Saúde da Nova Southeastern University, pelo Suporte Financeiro para a realização da pesquisa.

- “Fully functioning persons write the script of their own lives and respect the connectiveness of all things along the way.
- We cannot always be what others want us to be, for what they want may not be what we are and that is all that we have.
- It is what we do, rather than what we feel, or say we do, that reflects who and what we truly are.
- It is in the productive act itself where the power and significance of being individual is present.
- The self that we are now contains the actualization potential which will fulfill us.
- We are all much less than we can be.”

(Leo F. Buscaglia – Personhood – The Art of Being Fully Human.
Fawcett Columbine: New York, 1978)

Safioti LML. Comparação dos níveis de histatinas da saliva da parótida entre sujeitos com doença periodontal e sujeitos sem história prévia de doença periodontal [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2005.

RESUMO

As histatinas são uma família de peptídeos presentes nas secreções salivares humanas tendo como membros mais importantes da família as histatinas 1, 3 e 5. Diversos trabalhos demonstraram atividade inibitória das histatinas sobre produtos bacterianos e derivados do hospedeiro envolvidos na doença periodontal, sugerindo uma função importante de defesa das histatinas na cavidade bucal na presença de doença periodontal. Este estudo teve por objetivo comparar as quantidades de histatinas 1, 3 e 5 e o total de histatinas presentes na saliva da parótida entre sujeitos com doença periodontal e sujeitos sem história prévia de doença periodontal. Participaram do estudo 20 sujeitos da pesquisa com doença periodontal e 20 sujeitos sem história prévia de doença periodontal. As coletas da secreção da parótida foram realizadas sob condições de estimulação gustativa com balas ácidas com auxílio de um coletor de saliva Carlson-Crittenden posicionado sobre o ducto de Stenson e conectado a um cilindro de borracha resfriado em gelo. A quantificação de histatinas presentes nas secreções salivares foi realizada pelo procedimento de precipitação por zinco seguido por quantificação utilizando-se cromatografia líquida de alta pressão de fase reversa. Não foram encontradas diferenças significativas nas quantidades de histatinas na saliva da parótida entre sujeitos com doença periodontal e sujeitos sem história prévia de doença periodontal, indicando que a doença periodontal não estimula o sistema não imune ou inato do hospedeiro a uma maior produção e liberação de histatinas na cavidade bucal.

Palavras-Chave: Histatinas – Saliva – Doença periodontal

Safioti LML. Comparison of histatin levels between periodontally healthy and diseased subjects [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2005

ABSTRACT

Histatins are a family of peptides present in human salivary secretions. The major members of this family are histatins 1, 3, and 5. Several studies have shown inhibitory properties of histatins on bacterial and host-derived products which suggest an important role of defense for histatins in the presence of periodontal disease. This study aimed at comparing the levels of histatins 1, 3, and 5, and the total histatins in parotid saliva between periodontally healthy and compromised subjects. Twenty subjects with periodontal disease and twenty subjects with no previous history of periodontal disease had saliva samples collected from the parotid gland under gustatory stimulation using sour candies with the aid of a Carlson-Crittenden device positioned over the Stenson's duct and connected to a polypropylene graduated cylinder chilled on ice. Histatins levels were quantified using the two-step procedure using zinc precipitation of histatins followed by reversed-phase high performance liquid chromatography. No statistical differences were found for levels of histatins 1, 3, and 5, and for the total histatins between periodontally healthy and compromised subjects, showing that the periodontal disease does not trigger a higher production and output of histatins by the innate host defense system.

Key words: Histatins – Saliva – Periodontal disease

LISTA DE TABELAS

Tabela 5.1 - Quantidades médias das histatinas 1, 3 e 5 nos Grupos Saúde (n=12) e Doença (n=20)	36
Tabela 5.2 - Quantidades totais de histatinas nos Grupos Saúde (n=12) e Doença (n=20).....	36
Tabela 5.3 - Quantidades de histatinas em µg/ml nos Grupos Saúde (n=12) e Doença (n=20)	37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

MMP	matrizmetaloproteinase
IL	interleucina
HRP	proteína rica em histidina
TFA	ácido trifluoroacético

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	grau Celsius
n	tamanho da amostra
h	hora
g	grama
ml	mililitro
mm	milímetro
µg/ml	micrograma por mililitro
ml/min	mililitro por minuto
mM	milimol
nm	nanômetro
Ho	hipótese nula
α	valor alpha

SUMÁRIO

p.

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1 Características gerais das histatinas	19
2.2 Funções das histatinas	22
3 PROPOSIÇÃO	28
4 MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1 Casuística	29
4.2 Coleta de saliva da parótida	31
4.3 Processamento das histatinas	32
4.4 Análise estatística	34
5 RESULTADOS	35
5.1 Resultados para a amostra analisada	35
5.2 Resultados estatísticos	37
6 DISCUSSÃO	40
7 CONCLUSÕES	44
REFERÊNCIAS	45
APÊNDICES	50
ANEXOS	58

1 INTRODUÇÃO

A saliva contém uma série de componentes que interagem com microorganismos controlando a composição da microbiota bucal e desempenhando um papel de manutenção e proteção da saúde bucal. As imunoglobulinas fazem parte do sistema imune adquirido do hospedeiro e fornecem uma função protetora específica contra a penetração de patógenos. Existem também componentes do sistema não imune ou inato do hospedeiro na saliva desempenhando funções protetoras, como as lisozimas, cistatinas, lactoferrinas, lactoperoxidases, aglutininas, mucinas, defensinas e histatinas, entre outros elementos (NIEUW AMERONGEN; VEERMAN, 2002).

As histatinas são uma família de peptídeos ricos em histidinas (aminoácidos básicos incorporados às proteínas que participam do mecanismo catalítico de várias enzimas) presentes nas secreções salivares humanas (OPPENHEIM et al., 1988).

As histatinas são sintetizadas nas células acinares serosas das glândulas parótidas e submandibulares e nas células semilunares serosas das glândulas sublinguais, conforme determinado por localização imunocitoquímica das histatinas nas glândulas salivares humanas (AHMAD et al., 2004), e são secretadas na saliva com ou sem estimulação do fluxo salivar (HELMERHORST et al., 1997). A estimulação gustativa para a liberação de histatinas é efetiva e a concentração de histatinas não varia significativamente apesar da grande variação do fluxo salivar entre sujeitos, exceto por um aumento na concentração de histatinas se houver estimulação do fluxo por ácido cítrico a 5% (JENSEN et al., 1994).

As concentrações de histatinas secretadas na saliva variam consideravelmente na população, com valores entre 30 e 425 µg/ml para as secreções da parótida e entre 55 e 347 µg/ml para as secreções da submandibular e sublingual (TSAI; BOBEK, 1998).

Doze peptídeos de histatinas foram isolados e caracterizados até o momento (OPPENHEIM et al., 1988; TROXLER et al., 1990). Os membros mais importantes dessa família são as histatinas 1, 3 e 5, que constituem mais de 80% do total de histatinas na saliva (OPPENHEIM et al., 1988).

Assim como outras moléculas salivares, as histatinas são multifuncionais. A primeira função atribuída às histatinas foi seu envolvimento na formação da película adquirida do esmalte devido a sua alta afinidade por hidroxiapatita e superfícies de esmalte dentário (histatina 1) (HAY, 1975). As histatinas também possuem atividades fungicidas e fungistáticas contra *C. albicans* (GYURKO et al., 2000; HELMERHORST et al., 1997; OPPENHEIM et al., 1988; XU et al., 1990, 1991;).

As histatinas exibem atividades antibacterianas de formas direta e indireta. A atividade antibacteriana direta das histatinas inclui efeitos bactericidas e inibitórios no crescimento de *Streptococcus mutans* (MACKAY et al., 1984), *Actinomyces odontolyticus*, *Actinomyces naeslundii* e *Actinomyces viscosus* (KALPIDIS et al., 1992). A histatina 5 inibe a agregação e a atividade de hemoaglutinação de *Porphyromonas gingivalis*, ligando-se à célula bacteriana, o que sugere um obstáculo à colonização bacteriana nos tecidos bucais (MURAKAMI et al., 1990a, 1990b, 1991, 1992).

Os efeitos antibacterianos indiretos das histatinas incluem atividade inibitória da histatina 5 sobre as gingipains (GUSMAN et al., 2001) e sobre as leucotoxinas produzidas por *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (MURAKAMI et al., 2002).

Além disso, a histatina 5 inibe as matrizmetaloproteinases 9 e 2 (MMP-9 e MMP-2) (GUSMAN et al., 2001) e a indução das citocinas inflamatórias interleucina 6 e 8 (IL-6 e IL-8) por fibroblastos induzida por *P. gingivalis* (IMATANI et al., 2000).

Poucos estudos mostraram comparações entre níveis de componentes salivares, que podem variar entre sujeitos saudáveis e com doença periodontal. Os níveis de cistatinas apresentaram-se elevados na saliva de sujeitos com periodontite quando comparados aos de sujeitos sem doença periodontal (HENSKENS et al., 1994). Em nosso conhecimento, até o momento atual não foi relatada comparação dos níveis de histatinas entre sujeitos com doença periodontal e sujeitos sem história prévia de doença periodontal.

A atividade inibitória das histatinas demonstrada *in vitro* sobre substâncias bacterianas e derivadas do hospedeiro conhecidamente envolvidas na doença periodontal sugere uma função de defesa para estas proteínas em relação a etiologia e progressão da doença periodontal. Seria interessante conhecer os níveis destas proteínas com propriedades antibacterianas na ausência e na presença de doença periodontal como mais um passo para a compreensão do possível papel das histatinas no processo de doença periodontal.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Características gerais das histatinas

Azen (1973) identificou uma família de proteínas salivares básicas de baixo peso molecular que, posteriormente, mostraram-se ricas em histidina (PETERS; AZEN, 1977). Baum et al. (1976) e Baum, Bird e Longton (1977) descreveram pela primeira vez a isolamento e caracterização parcial do que os autores chamaram de proteínas salivares ricas em histidinas (HRPs).

Oppenheim et al. (1988) analisaram HRPs da secreção da glândula parótida de humanos por meio de eletroforese em um sistema PAGE catiônico e nomearam estas proteínas histatinas, fornecendo evidências de que as sete histatinas encontradas por eles eram correspondentes às HRPs 1 a 7 caracterizadas anteriormente por Baum et al. (1976) e Baum, Bird e Longton (1977). As sete histatinas foram isoladas por meio de cromatografia líquida de fase reversa revelando que as histatinas 1, 3 e 5 totalizaram 85-90% destas proteínas, sendo consideradas como os componentes principais da família pelos autores. A estrutura destes peptídeos foi caracterizada mostrando que as histatinas 1, 3 e 5 continham 38, 32 e 24 resíduos de aminoácidos, respectivamente, e sete resíduos de histidina cada uma, sendo que a histidina compunha 18-29% dos aminoácidos presentes, o que é incomum, uma vez que a histidina é normalmente o aminoácido menos abundante nas proteínas. A sequência de aminoácidos dos primeiros 22 resíduos das histatinas 1, 3 e 5 se mostraram idênticas com exceção da substituição de Glu e

Arg (resíduos 4 e 11) presentes na histatina 1, por Ala e Lys, nas histatinas 3 e 5, respectivamente, e a presença de uma fosfoserine (serina fosforilada) no resíduo 2 da histatina 1 que não estava presente nas histatinas 3 e 5. A estrutura primária da histatina 5 se mostrou idêntica a seqüência de 24 resíduos do aminoterminal da histatina 3. Os autores comentaram que, embora as histatinas tenham sido previamente consideradas proteínas básicas, este estudo revelou que a histatina 1 é uma molécula neutra e que as histatinas 3 e 5 são básicas. Os autores também sugeriram que as histatinas 1 e 3 são derivadas de diferentes genes, enquanto que a histatina 5 é um produto proteolítico da histatina 3.

Troxler et al. (1990) identificaram e caracterizaram os doze peptídeos de histatinas conhecidos até o momento por meio de análise em eletroforese em um sistema PAGE catiônico e cromatografia líquida de fase reversa. Os autores concluíram que as histatinas 2 e as histatinas 4 a 12 eram derivadas da degradação proteolítica das histatinas 1 e 3, respectivamente.

A histatina 1 foi descoberta ao ser demonstrado que esta proteína possuía alta afinidade e adsorvia-se a hidroxiapatita e ao esmalte (HAY, 1973, 1975), o que implicou sua participação como precursora na formação da película adquirida do esmalte (MAYHALL, 1970). Esta função pode ser em parte atribuída a fosfoserina presente na histatina 1, que também é encontrada em proteínas que demonstram afinidade por hidroxiapatita tais como proteínas ricas em prolina (PRPs) e estaterina. Esta função sugeriu que as histatinas desempenhem um papel na estabilização das interações minerais do fluido bucal, que é responsável pela manutenção da integridade da superfície de esmalte (OPPENHEIM et al., 1986).

Troxler et al. (1990) sugeriram que, pelo fato de a histatina 1 ser uma fosfoproteína, sua principal função seja a de precursora da película adquirida do

esmalte e inibidora do crescimento de cristais de hidroxiapatita, enquanto que a principal função das histatinas não fosforiladas seja antimicrobiana. As histatinas 3 e 5, que não são fosforiladas, exibem menor afinidade por superfícies de hidroxiapatita.

Glusker (1991) observou que as histatinas são proteínas peculiares por seu elevado conteúdo de histidina. As cadeias laterais de histidina, em especial, e de serina, tirosina e ácidos aspártico e glutâmico participam da grande afinidade das histatinas por metal. O autor ainda comentou que 13 dos 24 resíduos de aminoácidos na histatina 5 são potenciais ligadores a metal.

Gusman et al. (2000) avaliaram a capacidade da histatina 5 sintética de se ligar a cobre e zinco, metais presentes nas secreções salivares e na saliva total, por meio de um ensaio de competição por espectrofotometria. Os resultados demonstraram que a histatina 5 se ligou a cobre e zinco formando complexos histatina-metal em solução aquosa em pH fisiológico e os autores sugeriram que esses metais sejam capazes de se ligar as histatinas da saliva sob condições fisiológicas.

Flora et al. (2001) desenvolveram uma técnica para isolamento das histatinas 1, 3 e 5 da saliva da parótida baseada na capacidade de formação de complexos entre histatinas e zinco. A técnica consistiu na precipitação das histatinas por zinco seguida da quantificação das histatinas por cromatografia líquida de alta pressão de fase reversa. Os autores concluíram que a precipitação por zinco é um método efetivo para isolamento destas proteínas.

Gusman et al. (2004) analisaram a variação na secreção diária de histatinas pela glândula parótida em dez sujeitos da pesquisa que tiveram sua saliva da parótida coletada com estimulação gustativa em quatro diferentes horários do dia:

9:35 h; 12:40 h; 14:50 h e 17:00 h. As concentrações de histatinas foram determinadas pela técnica de precipitação por zinco seguida por quantificação por cromatografia líquida de alta pressão de fase reversa. Os autores concluíram que existem diferenças significativas nas concentrações de histatinas da saliva da parótida nos diferentes horários do dia para um mesmo sujeito, tendo sido os picos de produção de histatinas pela parótida observados por volta do meio do dia (12:40 h e 2:50 h). Os autores concluíram também que existiu uma grande variação na concentração de histatinas entre os diferentes sujeitos da pesquisa.

2.2 Funções das histatinas

A propriedade mais significativa das histatinas é sua eficaz atividade antifúngica bucal, particularmente contra o patógeno oportunista *Candida albicans* (HELMERHORST et al., 1997; POLLOCK et al., 1984; XU et al., 1991).

Estudos *in vitro* demonstraram que as histatinas 1, 3 e 5 têm capacidade de eliminar este fungo patogênico de uma maneira dose-dependente (OPPENHEIM et al., 1988) e estudos clínicos sugeriram que as histatinas podem limitar o crescimento de *C. albicans* e prevenir a candidíase *in vivo* (JAINKITTIVONG; JOHNSON; YEH, 1998).

Grande progresso tem sido feito para a elucidação do mecanismo fungicida de ação da *C. albicans*. Foi demonstrado que a histatina 5 é internalizada na célula e que seu alvo na *C. albicans* é a mitocôndria energizada (HELMERHORST et al., 1999b). Em concordância com este estudo, foi demonstrado que mutantes de *C.*

albicans com deficiência na respiração são resistentes a histatina 5 (GYURKO et al., 2000).

As atividades antibacterianas diretas e indiretas exercidas pelas histatinas têm sido relatadas em uma série de estudos *in vitro*. A atividade antibacteriana direta das histatinas foi demonstrada pela inibição do crescimento de várias cepas de *Streptococcus mutans* (MACKAY et al., 1984) e de *Actinomyces odontolyticus*, *Actinomyces naeslundii* e *Actinomyces viscosus* (KALPIDIS; XU; OPPENHEIM, 1992).

Helmerhorst et al. (1997) desenvolveram análogos sintéticos da histatina 5 (denominados dhvar 1 a dhvar 4) pela substituição de aminoácidos em sua seqüência genética e mostraram que esses peptídeos análogos da histatina 5 possuíram atividade inibitória mais forte contra *C. albicans* e contra algumas bactérias como *S. mutans*, *Fusobacterium nucleatum* e *Veillonella parvula*.

A susceptibilidade das bactérias a agentes antimicrobianos é reduzida pela organização das bactérias em complexos biofilmes (COSTERTON et al., 1995). Helmerhorst et al. (1999a) testaram a atividade antibacteriana *in vitro* de análogos sintéticos de histatina 5 no biofilme bucal em um modelo simplificado de biofilme formado em discos de hidroxiapatita e em bactérias coletadas da saliva e da placa bacteriana de quatro sujeitos saudáveis. Os autores concluíram que o análogo sintético de histatina 5 causou uma redução significativa na quantidade de bactérias gram-negativas anaeróbicas facultativas e obrigatórias presentes na saliva e na placa, e que as bactérias gram-negativas anaeróbicas obrigatórias (*Veillonella parvula*, *Fusobacterium nucleatum* e *Prevotella intermedia*) foram significativamente mais suscetíveis ao análogo sintético de histatina 5 do que as bactérias anaeróbicas

facultativas (*Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus salivarius* e *Actinomyces naeslundii*).

Porphyromonas gingivalis é uma bactéria gram-negativa associada à patogênese da doença periodontal (TRAVIS et al., 1997). Murakami et al. (1990a, 1990b, 1991, 1992) estudaram a atividade da histatina 5 sobre *P. gingivalis* e concluíram que a histatina 5 inibiu a atividade de hemoaglutinação de *P. gingivalis* pela ligação a um componente específico da célula bacteriana, sugerindo que as histatinas possam ter uma função protetora na prevenção da colonização dos tecidos bucais por *P. gingivalis*.

Proteínas presentes na superfície externa da membrana e lipopolissacarídeos de *P. gingivalis* induzem a produção *in vitro* das interleucinas 6 e 8 (IL-6 e IL-8) por fibroblastos do periodonto (IMATANI et al., 1998). Estas interleucinas são importantes mediadores inflamatórios nas doenças periodontais (YOSHIMURA et al., 1997). Imatani et al. (2000) estudaram os efeitos da histatina 5 sintética sobre a indução de citocinas inflamatórias por fibroblastos gengivais causada por proteínas da membrana externa de *P. gingivalis*. A liberação de citocinas pelos fibroblastos foi medida pelo teste ELISA. A histatina 5 sintética inibiu a indução *in vitro* de IL-6 e IL-8 por proteínas da membrana externa do patógeno periodontal *P. gingivalis*, levando os autores a sugerirem a possibilidade de que a exposição das histatinas às proteínas da membrana externa da *P. gingivalis* reduza a produção de citocinas inflamatórias a partir de fibroblastos humanos *in vivo*.

Gusman et al. (2001) estudaram o potencial da histatina 5 sintética e derivados sintéticos da histatina 5 em: 1) inibir a atividade proteolítica das matrizmetaloproteinases 2 e 9 (MMP-2 e MMP-9) produzidas pelo hospedeiro, consideradas iniciadoras importantes da degradação da matriz extracelular na

progressão da doença periodontal, e 2) inibir a atividade das enzimas gingipains produzidas por *P. gingivalis*, que degradam colágeno, imunoglobulinas e fatores complemento, entre outros componentes fisiológicos importantes. Os autores concluíram que a histatina 5 exibiu uma forte atividade inibitória contra MMP-2 e MMP-9 e chamaram a atenção para o fato de o zinco ser essencial para a atividade enzimática das MMPs e de a histatina 5 ter a propriedade de se ligar a íons metálicos incluindo zinco, conforme demonstrado pelos mesmos autores (GUSMAN et al., 2000). As histatinas 1 e 3 apresentaram uma atividade inibitória bastante reduzida, provavelmente por não conterem a seqüência responsável pela capacidade de ligação ao zinco, como ocorre com a histatina 5. Os autores sugeriram um novo campo de ação para a histatina 5 como inibidora de enzimas dependentes de zinco, sendo capaz de interferir funcionalmente com enzimas que necessitem de metais para sua atividade ou para sua estrutura. Os autores também concluíram que a histatina 5 inibiu as enzimas gingipains derivadas de *P. gingivalis* e a consideraram uma inibidora de enzimas do hospedeiro e bacterianas envolvidas na destruição do periodonto.

Actinobacillus actinomycetemcomitans é uma bactéria anaeróbica implicada na patogênese de diversas formas de doença periodontal, principalmente em formas agressivas de periodontite (ZAMBON, 1985). Este patógeno sintetiza uma proteína chamada leucotoxina que exerce ação citotóxica sobre leucócitos polimorfonucleares destruindo os neutrófilos, que constituem a primeira linha de defesa do hospedeiro contra a invasão de microorganismos no sulco gengival (FIVES-TAYLOR et al., 1999). Murakami et al. (2002) investigaram o efeito *in vitro* da histatina 5 sintética sobre as leucotoxinas em um ensaio de citotoxicidade para leucócitos polimorfonucleares isolados do sangue de sujeitos saudáveis. Os autores concluíram

que a histatina 5 neutralizou o efeito tóxico da leucotoxina produzida por *A. actinomycetemcomitans* de maneira concentração-dependente, sendo capaz de proteger os polimorfonucleares contra as leucotoxinas, e sugeriram mecanismos de inibição pelos quais a histatina 5 neutralize diretamente a leucotoxina ou interfira com a interação entre a leucotoxina e o neutrófilo.

Paquette et al. (1997) examinaram os efeitos do uso tópico de histatinas em forma de gel no desenvolvimento de placa bacteriana e gengivite nos dentes pré-molares de 16 cães *beagle* durante dez semanas. Os cães foram divididos em quatro grupos que receberam a aplicação de um gel contendo placebo ou uma das três histatinas sintéticas contendo diferentes quantidades de seqüências de aminoácidos (histatina 5, P-113 ou P-113D). As histatinas sintéticas foram preparadas pelo laboratório comercial Periodontix, Inc. (Watertown, MA, EUA) e possuíam concentrações de histatinas de cinco a dez vezes maiores do que às encontradas na saliva humana. Os autores concluíram que, em um modelo em cães, a aplicação tópica do gel com P-113 resultou em 59% e 49% de redução na inflamação gengival e formação de placa bacteriana quando comparada a aplicação do gel com placebo. O tratamento com P-113D apresentou menores reduções e a histatina sintética 5 não apresentou reduções significativas nos parâmetros avaliados quando comparados ao placebo. Os autores sugeriram que, em um modelo em cães, as histatinas sintéticas em formulações para uso tópico pareceram ser opções promissoras para o tratamento e prevenção da gengivite.

Mickels et al. (2001) avaliaram a segurança, a prevenção do desenvolvimento de gengivite experimental em humanos e os efeitos na microbiota periodontal do uso de um enxaguatório bucal contendo P-113. Os 159 sujeitos da pesquisa foram divididos em quatro grupos, abstiveram-se de procedimentos de

higiene bucal e utilizaram o enxaguatório bucal contendo placebo ou 0,005%, 0,01% e 0,05% de P-113 duas vezes por dia durante 28 dias. Os resultados mostraram que não houve efeitos adversos relacionados ao tratamento ou mudanças nas amostras de microbiota supragengival coletadas no início e no final do estudo com nenhuma das três concentrações utilizadas. Os autores concluíram que o enxaguatório bucal com 0,01% de P-113 apresentou o maior efeito na redução do acúmulo de placa e controle de sangramento gengival entre as três concentrações de P-113 utilizadas.

Van Dyke et al. (2002) avaliaram a segurança, efeito antiplaca e antigengivite de um enxaguatório bucal contendo P-113 nas concentrações de 0,01% e 0,03% ou placebo usado duas vezes por dia durante 28 dias em 294 sujeitos saudáveis divididos em três grupos. A retenção de P-113 nos tecidos bucais também foi avaliada. Os autores concluíram que não houve efeitos adversos relacionados ao tratamento ou mudanças nas amostras de microbiota supragengival coletadas no início e no final do estudo com nenhuma das duas concentrações utilizadas e que houve uma redução significativa no sangramento à sondagem no grupo 0,01% P-113. Não houve diferença significativa entre os grupos 0,01% e 0,03% P-113 para os outros parâmetros. A retenção do P-113 na cavidade bucal após o enxágüe foi de até 35%, levando os autores a compararem sua substantividade a da clorexidina.

3 PROPOSIÇÃO

Os propósitos desta investigação científica são:

1- Comparar a quantidade de cada grupo de histatinas (histatina 1, histatina 3 e histatina 5) presentes na saliva da parótida entre pacientes com doença periodontal e indivíduos sem história prévia de doença periodontal;

2- Comparar a quantidade total de histatinas (histatina 1 + histatina 3 + histatina 5) presentes na saliva da parótida entre pacientes com doença periodontal e indivíduos sem história prévia de doença periodontal.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Casuística

Participaram deste estudo vinte sujeitos da pesquisa com doença periodontal com idades variando entre 35 e 71 anos (média 52 anos), onze mulheres e oito homens, e vinte sujeitos da pesquisa sem história prévia de doença periodontal com idades variando entre 22 e 68 anos (média 49 anos), dezoito mulheres e dois homens. Os quarenta sujeitos da pesquisa foram selecionados na Clínica de Graduação da Faculdade de Odontologia da Nova Southeastern University, Fort Lauderdale, Flórida, EUA.

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Nova Southeastern University (Apêndice A). Os sujeitos da pesquisa foram esclarecidos em relação ao propósito e metodologia da pesquisa e formalizaram sua participação livre e espontânea por meio do Consentimento Livre e Esclarecido de Participação em Pesquisa (Apêndice B).

Os sujeitos da pesquisa responderam um questionário de anamnese e foram submetidos a um exame clínico periodontal e a tomada de radiografias periapicais de boca toda para a determinação do diagnóstico periodontal. O exame clínico periodontal incluiu medidas em todos os quadrantes em seis sítios por dente com sonda periodontal Hu-Friedy CP-UNC para profundidade clínica de sondagem, nível clínico de inserção e sangramento à sondagem. Foram também avaliados envoltórios de furca e mobilidade dentária. O diagnóstico periodontal foi

determinado de acordo com a Classificação de Doença Periodontal da Academia Americana de Periodontia em 1999 (ARMITAGE, 1999). Com base no diagnóstico periodontal, os sujeitos da pesquisa foram divididos em Grupo “Saúde” e Grupo “Doença Periodontal”.

4.1.1 Critérios de inclusão

Para o Grupo Saúde, os critérios de inclusão foram ausência de perda óssea observável radiograficamente e ausência de sinais clínicos de doença periodontal.

Para o Grupo Doença Periodontal, os critérios de inclusão foram evidência radiográfica de perda óssea e diagnóstico clínico de Periodontite Crônica de Moderada a Severa.

4.1.2 Critérios de exclusão

Foram excluídos do estudo os sujeitos que apresentaram histórico de doença periodontal e que foram submetidos a tratamento periodontal prévio.

Também constituíram critérios de exclusão para ambos os grupos histórico de patologias nas glândulas salivares e quimioterapia conforme informação fornecida pelos sujeitos da pesquisa durante a anamnese, o que poderia alterar a função das glândulas parótidas.

4.2 Coleta de saliva da parótida

A saliva da parótida foi coletada com auxílio de um coletor de Carlson-Crittenden como previamente descrito (OPPENHEIM; HAY; FRANZBLAU, 1971) posicionado sobre o ducto de Stenson e conectado a um cilindro de borracha que conduzia a saliva até um tubo de ensaio resfriado em gelo. Após o posicionamento do coletor, a saliva do sujeito da pesquisa foi estimulada por meio de balas amargas (Hershey Foods Corporation, Hershey, PA). O primeiro 0,5 ml de cada amostra salivar foi descartado e foram coletados de 4 a 5ml de saliva da parótida de cada sujeito da pesquisa para o experimento. Após a coleta as amostras foram separadas em tubos Eppendorf de 1ml cada e congeladas a -20°C até que fosse realizado o experimento.

As amostras salivares foram coletadas em todos os sujeitos da pesquisa por volta das 13:00 horas para que se diminuísse a variação diária de secreção de histatinas na saliva previamente relatada na literatura.

Foram analisados dois tubos Eppendorf contendo 1ml de saliva cada para cada um dos quarenta sujeitos da pesquisa, totalizando oitenta tubos Eppendorf com amostras de saliva para o experimento.

Para identificação das amostras durante o estudo, os sujeitos do Grupo Saúde receberam letras de A e A-2 (sendo A a primeira amostra e A-2 a segunda amostra do sujeito da pesquisa letra A) até T e T-2. Os sujeitos do Grupo Doença receberam números de 1 e 1-2 (sendo 1 a primeira amostra e 1-2 a segunda amostra do sujeito da pesquisa número 1) até 20 e 20-2.

4.3 Processamento das histatinas

O processamento das histatinas presentes nas amostras salivares foi realizado utilizando-se o procedimento de precipitação por zinco seguido de quantificação por cromatografia líquida de alta pressão de fase reversa como descrito por Flora et al. (2001).

4.3.1 Precipitação das histatinas por zinco

A precipitação das histatinas por zinco foi realizada no laboratório de Pesquisa do Departamento de Periodontia da Faculdade de Odontologia da Nova Southeastern University, Fort Lauderdale, Flórida, EUA.

Os tubos Eppendorf foram retirados do congelador e mantidos resfriados em uma cuba até que descongelassem para a realização da precipitação das histatinas por zinco. A cada amostra de saliva foi adicionado cloreto de zinco a partir de uma solução estoque de 5mM e o conteúdo foi misturado (Super-Mixer, Curtin Matheson Scientific Inc, CMS). Em seguida o pH das soluções contendo saliva e cloreto de zinco foi elevado a 9,0 pela adição progressiva de hidróxido de sódio. O pH 9,0 em cada solução foi verificado por meio de tiras para leitura do pH (Color pHast Indicator Strips pH 5-10, EMS) e as amostras foram incubadas a 4°C por 20 minutos. Após centrifugação (Eppendorf Centrifuge 5415D) a 16,000 g por 20 minutos, o sobrenadante foi removido e descartado. Os sedimentos contendo complexos de

histatinas e zinco foram lavados com solução de zinco e água destilada e armazenados a -20°C. Os sedimentos de histatinas ligadas a zinco apareciam como diminutas nuvens brancas no fundo dos tubos Eppendorf.

4.3.2 Análise por cromatografia líquida de alta pressão de fase reversa

A quantificação das histatinas por cromatografia líquida de alta pressão de fase reversa foi realizada no laboratório de Pesquisa do Departamento de Periodontia e Biologia Oral da Faculdade de Odontologia da Boston University, Massachusetts, EUA.

As histatinas precipitadas com cloreto de zinco foram filtradas por uma membrana de 0,2 µm (HT Tuffryn, Gelman Laboratory, Ann Arbor, MI) e submetidas a cromatografia líquida de alta pressão de fase reversa (Model 715 Gilson HPLC, Middleton, WI) usando uma coluna 4,6 x 250 mm C₁₈ (TSK-GEL 5µm, ODS-120T, TOSOHaa, Montgomeryville, PA). O solvente A foi ácido trifluoroacético (TFA) 0,1% em água e o solvente B foi TFA 0,1% em 80% acetonitrile e 20% água. As proteínas foram separadas utilizando-se um gradiente linear variando de 0% a 55% B por um intervalo de tempo de 74 minutos a um fluxo de 1ml/min e o eluato foi monitorado a 230nm.

As quantidades de histatina 1, 3 e 5 a partir das amostras de 1 ml de saliva da parótida foram determinadas pela comparação das áreas de pico para essas amostras obtidas pela cromatografia líquida de alta pressão com as áreas de curva

padrão para cada histatina previamente determinadas submetendo-se quantidades conhecidas de histatinas à cromatografia líquida de alta pressão.

4.4 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada com auxílio do teste não paramétrico de Kolmogorov-Smirnov com auxílio do Software para análise estatística NCSS/PASS (NCSS/PASS, Dawson Edition, 2004). As variáveis estudadas foram comparação das quantidades de histatinas 1, 3 e 5 entre os dois grupos e comparação das quantidades totais de histatinas entre os dois grupos.

5 RESULTADOS

5.1 Resultados para a amostra analisada

Quarenta sujeitos da pesquisa tiveram suas amostras de saliva da parótida analisadas para quantificação das histatinas 1, 3 e 5 neste estudo. Entretanto, oito sujeitos do Grupo Saúde tiveram seus resultados descartados do estudo pelo fato de não terem sido detectadas áreas de pico das três histatinas nos cromatogramas para estes indivíduos. A ausência de histatinas nestas amostras salivares pode estar relacionada a algum erro de técnica laboratorial durante a precipitação das histatinas ou de quantificação destas amostras. Sendo assim, este estudo analisou os resultados para doze sujeitos do Grupo Saúde (n=12) e vinte sujeitos do Grupo Doença Periodontal (n=20).

As áreas de pico das histatinas 1, 3 e 5 foram calculadas a partir da leitura dos cromatogramas resultantes da análise por cromatografia líquida de alta pressão de fase reversa. Um exemplo de cromatograma de um sujeito do Grupo Saudável pode ser visto no Anexo A.

As quantidades individuais de cada histatina (1, 3 e 5) em cada grupo e os valores totais de histatinas (valor total sendo a soma das histatinas 1, 3 e 5) em cada grupo foram analisadas, de forma que se pôde comparar a quantidade de cada histatina entre os dois grupos e o valor total de histatinas entre os dois grupos. Todos os valores foram calculados considerando-se as duas amostras coletadas

para cada sujeito da pesquisa. O Apêndice C mostra os resultados das quantidades de histatinas 1, 3 e 5 nas amostras salivares dos sujeitos da pesquisa dos Grupos Saúde e Doença a partir das áreas de pico dos cromatogramas.

A Tabela 5.1 mostra as quantidades médias de cada histatina (1, 3 e 5) entre os dois grupos (Saúde e Doença).

Tabela 5.1-Quantidades médias das histatinas 1, 3 e 5 nos Grupos Saúde (n=12) e Doença (n=20)

	Grupo Saúde ($\pm$ Desvio Padrão)	Grupo Doença ($\pm$ Desvio Padrão)
Histatina 1	166486.8 (209503.4)	217357.8 (244722)
Histatina 3	131093.5 (154787.8)	268893.1 (248488.3)
Histatina 5	426380.5 (362271)	575998.1 (571872.8)

A Tabela 5.2 mostra as quantidades totais de histatinas (histatina 1 + histatina 3 + histatina 5) nos Grupos Saúde (n=12) e Doença (n=20).

Tabela 5.2-Quantidades totais de histatinas nos Grupos Saúde (n=12) e Doença (n=20)

	Grupo Saúde ($\pm$ Desvio Padrão)	Grupo Doença ($\pm$ Desvio Padrão)
Total de Histatinas	723960.9 (666821.3)	1062249 (1040876)

A Tabela 5.3 mostra os valores das áreas de pico convertidos para a quantidade de histatinas em $\mu\text{g/ml}$.

Tabela 5.3-Quantidades de histatinas em $\mu\text{g/ml}$ nos Grupos Saúde (n=12) e Doença (n=20)

	Grupo Saúde ($\mu\text{g/ml}$)	Grupo Doença ($\mu\text{g/ml}$)
Histatina 1	10,08	12,93
Histatina 3	7,04	13,91
Histatina 5	24,19	32,59
Total de Histatinas	41,31	59,43

5.2 Resultados estatísticos

5.2.1 Comparação entre as quantidades de histatina 1, 3 e 5 entre o Grupo Saúde e o Grupo Doença

O teste de normalidade para os dados obtidos entre os Grupos Saúde e Doença para as histatinas 1, 3 e 5 rejeitou a hipótese de normalidade para estes dados, portanto foi utilizado o teste não paramétrico de Kolmogorov-Smirnov.

Foi testada a hipótese nula de ausência de diferença entre as medidas de cada histatina entre os dois grupos versus a hipótese alternativa de presença de diferença significativa entre as medidas de cada histatina entre os dois grupos utilizando um valor alpha de 0,05 ($\alpha=0,05$).

Embora possam ser observadas diferenças nas médias das quantidades de cada histatina entre os Grupos Saúde e Doença, como mostra a Tabela 5.1, as diferenças entre estes valores não foram estatisticamente significativas (histatinas 1, 3 e 5, $p = 0,5064, 0,1148$ e $0,5811$, respectivamente).

Os Anexos B, C e D contêm os resultados do teste estatístico para a comparação das histatinas 1, 3 e 5, respectivamente, entre os dois grupos.

5.2.2. Comparação entre as quantidades totais de histatinas entre o Grupo Saúde e o Grupo Doença

O teste de normalidade para os dados obtidos entre os Grupos Saúde e Doença rejeitou a hipótese de normalidade para estes dados, portanto foi utilizado o teste não paramétrico de Kolmogorov-Smirnov.

Foi testada a hipótese nula de ausência de diferença entre as medidas dos dois grupos versus a alternativa de presença de diferença significativa entre as medidas dos dois grupos utilizando um valor alpha de 0,05 ($\alpha=0,05$).

Apesar da diferença nas médias de histatinas totais para os Grupos Saúde e Doença, a diferença entre estes valores não foi estatisticamente significativa ($p=0,26$).

O Anexo E contém os resultados do teste estatístico para a comparação da quantidade total de histatinas entre os dois grupos.

6 DISCUSSÃO

Estima-se que as histatinas sejam proteínas importantes na manutenção da saúde bucal por sua forte atividade antifúngica e antibacteriana e por seu efeito inibitório sobre enzimas que estão envolvidas na degradação do tecido conjuntivo bucal como apresentado na Revisão da Literatura.

Este estudo foi desenvolvido porque julgamos interessante conhecer o comportamento destas proteínas salivares antimicrobianas nas secreções das glândulas parótidas em sujeitos com saúde periodontal ou com doença periodontal, informação que não foi publicada na literatura até o presente momento.

Os resultados do presente estudo mostraram que as quantidades de histatinas presentes na saliva das glândulas parótidas dos sujeitos da pesquisa não foram estatisticamente diferentes na saúde e na doença periodontal.

É interessante observar que as médias das quantidades de histatinas entre o Grupo Saúde e o Grupo Doença se mostraram notavelmente diferentes. As médias do Grupo Doença apresentaram-se maiores quando comparadas às do Grupo Saúde para as variáveis histatina 1 e histatina 5 e, em maior grau, para a histatina 3, como pôde ser observado nas Tabelas 5.1 e 5.3 do Capítulo Resultados. As médias também se apresentaram maiores para o total de histatinas no Grupo Doença quando comparadas as do Grupo Saúde, como pôde ser observado nas Tabelas 5.2 e 5.3 do Capítulo Resultados. Entretanto, apesar das diferenças nas médias para todas as variáveis entre os dois grupos, tais diferenças não foram estatisticamente significativas.

É pertinente observar também a larga variação nas quantidades de histatinas nas amostras salivares obtidas de diferentes sujeitos da pesquisa dentro do mesmo grupo. Esta variação pode ser observada pelo desvio padrão descrito nas Tabelas 5.1 e 5.2 do Capítulo Resultados. Esses dados confirmam os dados anteriormente relatados na literatura sobre a grande variação nas quantidades de histatinas na população (JENSEN et al., 1994; GUSMAN et al., 2004). As concentrações de histatinas encontradas em µg/ml neste estudo mostraram-se de acordo com as concentrações previamente encontradas por Tsai e Bobek (1998).

Cabe ressaltar que as coletas das amostras de secreções salivares para o presente estudo foram realizadas sempre por volta do meio do dia em todos os sujeitos da pesquisa. Esse cuidado foi tomado na tentativa de se padronizar o horário de coleta para todos os sujeitos devido à previamente relatada variação diária na secreção de histatinas pelas glândulas parótidas em um mesmo sujeito (GUSMAN et al., 2004).

Devemos considerar que o presente estudo analisou uma amostra pequena de sujeitos da pesquisa (doze sujeitos sem doença periodontal e vinte sujeitos com doença periodontal). Desta forma, nossos resultados e conclusões são aplicáveis à limitada amostra utilizada neste estudo.

Nossos resultados nos levaram a observar que a presença de doença periodontal não estimulou uma maior produção e liberação de histatinas na cavidade bucal pelo sistema não imune do hospedeiro. Foram encontradas maior produção e liberação de cistatinas, componentes salivares que inibem enzimas envolvidas na progressão da doença periodontal por degradarem colágeno, na saliva total e da parótida de sujeitos com periodontite quando comparados a sujeitos com periodonto

saudável em um estudo de Henskens et al. (1994), levando os autores a sugerirem uma resposta das glândulas salivares à condição inflamatória da cavidade bucal.

A participação ativa das histatinas na cavidade bucal na presença de doença periodontal seria um fenômeno interessante do ponto de vista biológico se as histatinas pudessem exercer *in vivo* as mesmas atividades antimicrobianas demonstradas *in vitro* até o momento, não só sobre as bactérias e suas enzimas como também sobre as enzimas produzidas pelo hospedeiro no processo de doença periodontal. Estas atividades antimicrobianas *in vivo* ainda foram muito pouco estudadas e relatadas na literatura, existindo até o momento poucos estudos clínicos relatando o uso de bochechos formulados a partir de análogos de histatinas para o controle da gengivite.

No que concerne à ação das histatinas em casos de periodontite, mais especificamente à ação das histatinas sobre as bactérias presentes no interior de bolsas periodontais ou sobre as enzimas que atuam nos tecidos periodontais, fica a dúvida da capacidade destas histatinas liberadas na saliva de penetrarem no interior das bolsas periodontais e dos tecidos. O contato das histatinas com bactérias e enzimas pode ser prejudicado devido ao fato de a profundidade das bolsas periodontais poderem representar, juntamente com o fluxo constante do fluido gengival, barreiras ao contato direto das histatinas com estas bactérias e enzimas presentes na bolsa periodontal e nos tecidos e envolvidas na progressão da doença periodontal.

Foi sugerido por Murakami et al. (2002) que a neutralização de toxinas provenientes de patógenos bucais demonstrada pelas histatinas pode ser um indício de que estas proteínas sejam antibióticos naturais e possam fornecer bases para o desenvolvimento de tratamentos antimicrobianos.

Uma vantagem na utilização destas proteínas como possíveis drogas antimicrobianas seria o fato de elas já serem encontradas naturalmente na saliva do hospedeiro, de forma que, muito provavelmente, não haveria efeitos adversos decorrentes de seu uso e elas seriam bem toleradas se aplicadas clinicamente, como observado por Kavanagh e Dowd (2004), e não provocariam resistência bacteriana (NIEW AMERONGEN; BOLSCHER; VEERMAN, 2004).

Devido às comprovadas características antimicrobianas das histatinas, abrem-se campos de interesse e pesquisa relativos ao comportamento destas proteínas salivares no processo de doença periodontal e ao uso destas proteínas como agentes terapêuticos. No campo da Periodontia, isto pode significar o estudo e desenvolvimento de medicamentos de liberação controlada para aplicação direta no interior de bolsas periodontais.

7 CONCLUSÕES

Dentro dos limites deste estudo pudemos concluir que:

- 7.1 Não existiram diferenças estatisticamente significativas entre as quantidades de histatinas 1, 3 e 5 presentes na saliva da glândula parótida em sujeitos da pesquisa sem história prévia de doença periodontal (Grupo Saúde) e sujeitos com doença periodontal (Grupo Doença);
- 7.2 Não existiram diferenças estatisticamente significativas entre as quantidades totais de histatinas presentes na saliva da glândula parótida em sujeitos da pesquisa sem história prévia de doença periodontal (Grupo Saúde) e sujeitos com doença periodontal (Grupo Doença).

REFERÊNCIAS¹

- Ahmad M, Piludu M, Oppenheim FG, Helmerhorst EJ, Hand AR. Immunocytochemical localization of histatins in human salivary glands. *J Histochem Cytochem* 2004;52(3):361-70.
- Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol* 1999;4:1-5.
- Azen, EA. Properties of salivary basic proteins showing polymorphism. *Biochem Genet* 1973;9:69-86.
- Baum BJ, Bird JL, Millar DB, Longton RW. Studies on histidine-rich polypeptides from human parotid saliva. *Arch Biochem Biophys* 1976;177: 427-36.
- Baum BJ, Bird JL, Longton RW. Polyacrylamide gel electrophoresis of human salivary histidine-rich polypeptides. *J Dent Res* 1977;56:1115-8.
- Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM. Microbial biofilms. *Ann Rev Microbiol* 1995;49:711-45.
- Fives-Taylor PM, Meyer DH, Mintz KP, Brissette C. Virulence factors of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Periodontol* 2000 1999;20:136-67.
- Flora B, Gusman H, Helmerhorst EJ, Troxler RF, Oppenheim, FG. A new method for the isolation of histatins 1, 3, and 5 from parotid secretion using zinc precipitation. *Protein Expression and Purification* 2001;23:198-206.
- Glusker, JP. Structural aspects of metal liganding to functional groups in proteins. *Adv Protein Chem* 1991;42:1-76.
- Gusman H, Lendenmann U, Grogan J, Troxler RT, Oppenheim FG. Is salivary histatin 5 a metallopeptide? *Biochim Biophys Acta* 2000;1-10.

---

¹ De acordo com Estilo Vancouver. Abreviatura de periódicos segundo base de dados MEDLINE.

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. *Infect Immunol* 2001;69:1402-8.

Gusman H, Leone C, Helmerhorst EJ, Nunn M, Flora B, Troxler R, et al. Human salivary gland-specific daily variations in histatin concentrations determined by a novel quantitation technique. *Arch Oral Biol* 2004;49:11-22.

Gyurko C, Lendenmann U, Troxler R, Oppenheim F. *Candida albicans* mutants deficient in respiration are resistant to the small cationic salivary antimicrobial peptide histatin 5. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;40:348-54.

Hay, DI. The interaction of human parotid salivary proteins with hydroxyapatite. *Arch Oral Biol* 1973; 18:1517-29.

Hay DI. Fractionation of human parotid salivary proteins and the isolation of an histidine-rich acidic peptide which shows high affinity for hydroxyapatite surfaces. *Arch Oral Biol* 1975;20:553-8.

Helmerhorst EJ, van't Hof W, Veerman ECI, Simoons-Smit AM, Nieuw Amerongen AV. Synthetic histatin analogs with broad-spectrum antimicrobial activity. *Biochem J* 1997;326:39-45.

Helmerhorst EJ, Hodgson R, van't Hof W, Veerman EC, Allison C, Nieuw Amerongen AV. The effects of histatin-derived basic antimicrobial peptides on oral biofilms. *J Dent Res* 1999a;78:1245-50.

Helmerhorst EJ, Breeuwer P, van't Hof W, Walgreen-Weterings E, Oomen LC, Veerman EC, et al. The cellular target of histatin 5 on *Candida albicans* is the energized mitochondrion. *J Biol Chem* 1999b; 274:7286-91.

Henskens YMC, Veerman ECI, Mantel MS, van der Velden U, Nieuw Amerongen AV. Cystatins S and C in human whole saliva and in glandular salivas in periodontal health and disease. *J Dent Res* 1994;73:1606-14.

Imatani T, Kato T, Minaguchi K, Okuda K. Histatin 5 inhibits inflammatory cytokine induction from human gingival fibroblasts by *Porphyromonas gingivalis*. *Oral Microbiol Immunol* 2000;15:378-82

Imatani T, Miura T, Ishihara K, Kato T, Okuda K. Induction of IL-6 by cell-surface preparations from *Porphyromonas gingivalis*. J Dent Res 1998;77:1296.

Jainkittivong A, Johnson DA, Yeh C-K. The relationship between salivary histatin levels and oral yeast carriage. Oral Microbiol Immunol 1998;13:181-7.

Jensen JL, Xu T, Lamkin MS, Brodin P, Aars H, Berg T, Oppenheim FG. Physiological regulation of the secretion of histatins and statherins in human parotid saliva. J Dent Res 1994;73(12):1811-17.

Kalpidis CD, Xu T, Oppenheim FG. Effects of human salivary histatin 5 on *Actinomyces* species. J Dent Res 1992;71:305.

Kavanagh K, Dowd S. Histatins: antimicrobial peptides with therapeutic potential. J Pharm Pharmacol 2004;56:285-9.

MacKay BJ, Denepitiya L, Iacono VJ, Krost SB, Pollack JJ. Growth-inhibitory and bactericidal effects of human parotid salivary histidine-rich polypeptides on *Streptococcus mutans*. Infection Immunity 1984;44:695-701.

Mayhall CW. Concerning the composition and source of the acquired enamel pellicle of human teeth. Arch Oral Biol 1970;15:1327-41.

Mickels N, McManus C, Massaro J, Friden P, Braman V, D'Agostino R, et al. Clinical and microbial evaluation of a histatin-containing mouthrinse in humans with experimental gingivitis. J Clin Periodontol 2001;28:404-10.

Murakami Y, Takeshita T, Shizukuishi S, Tsunemitsu A, Aimoto S. Inhibitory effects of synthetic histidine-rich peptides on hemagglutination by *Bacteroides gingivalis* 381. Arch Oral Biol 1990a;35:775-7.

Murakami Y, Amano A, Takagaki M, Shizukuishi S, Tsunemitsu A, Aimoto S. Purification and characterization from human parotid secretion of a peptide which inhibits hemagglutination of *Bacteroides gingivalis* 381. FEMS Microbiol Lett 1990b;72:275-80.

Murakami Y, Shizukuishi S, Tsunemitsu A, Nakashima K, Kato Y, Aimoto S. Binding of a histidine-rich peptide to *Porphyromonas gingivalis*. FEMS Microbiol Lett 1991;66:253-356.

Murakami Y, Tamagawa H, Shizukuishi S, Tsunemitsu A, Aimoto S. Biological role of an arginine residue present in histidine-rich peptide which inhibits hemagglutination of *Porphyromonas gingivalis*. FEMS Microbiol Lett 1992;77:201-4.

Murakami Y, Xu T, Helmerhorst EJ, Ori G, Troxler RF, Lally ET, Oppenheim FG. Inhibitory effect of synthetic histatin 5 on leukotoxin from *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Oral Microbiol Immunol 2002;17:143-9.

Nieuw Amerongen AV, Bolscher JGM, Veerman ECI. Salivary proteins: protective and diagnostic value in cariology? Caries Res 2004;38:247-53.

Nieuw Amerongen AV, Veerman ECI. Saliva – the defender of the oral cavity. Oral Dis 2002;8:12-22.

Oppenheim FG, Hay DI, Franzblau C. Proline-rich proteins from human parotid saliva. I. Isolation and characterization. Biochemistry 1971;10:4233-8.

Oppenheim FG, Yang YC, Diamond RD, Hyslop D, Offner GD, Troxler RF. The primary structure and functional characterization of the neutral histidine-rich polypeptide from human parotid secretion. J Biol Chem 1986;261:1177-82.

Oppenheim FG, Xu T, McMillian FM, Levitz SM, Diamond RD, Offner GD, et al. Histatins, a novel family of histidine-rich proteins in human parotid secretion. Isolation, characterization, primary structure and fungistatic effects on *Candida albicans*. J Biol Chem 1988;263:7472-77.

Paquette, DW, Waters GS, Stefanidou VL, Friden P, Hutchens LH, Lawrence HP, et al. Inhibition of experimental gingivitis in beagle dogs with topical salivary histatins. J Clin Periodontol 1997;24:216-22.

Peters EH, Azen EA. Isolation and partial characterization of human parotid basic proteins. Biochem Genet 1977;15:925-46.

Pollock JJ, Denepitiya L, MacKay BJ, Iacono VJ. Fungistatic and fungicidal activity of human parotid saliva histidine-rich polypeptides on *Candida albicans*. Infect Immunol 1984;44:702-7.

Travis J, Pike R, Imamura T, Potempa J. *Porphyromonas gingivalis* proteinases as virulence factors in the development of periodontitis. J Periodontol Res 1997;32:120-5.

Troxler RF, Offner GD, Xu T, Vanderspek JC, Oppenheim FG. Structural relationship between human salivary histatins. J Dent Res 1990;69:2-6.

Tsai H, Bobek LA. Human salivary histatins: promising anti-fungal therapeutic agents. Crit Rev Oral Biol Med 1998;9:480-97.

Van Dyke T, Paquette D, Grossi S, Braman V, Massaro J, D'Agostino, R, Dibart S, Friden P. Clinical and microbiological evaluation of a histatin containing mouthrinse in humans with experimental gingivitis: a phase 2 multi-center study. J Clin Periodontol 2002;29:168-76.

Xu T, Tesler E, Troxler RF, Oppenheim FG. Primary structure and anticandidal activity of the major histatin from parotid secretion in the subhuman primate, *Macaca fascicularis*. J Dent Res 1990;69:1717-23.

Xu T, Levitz SM, Diamond RD, Oppenheim FG. Anticandidal effect of major human salivary histatins. Infection and Immunity 1991;59:2549-54.

Yoshimura A, Hara Y, Kaneko T, Kato I. Secretion of IL-1 β , TNF- α , IL-8 and IL-1ra by human polymorphonuclear leukocytes in response to lipopolysaccharides from periodontopathic bacteria. J Periodontal Res 1997;32:279-86.

Zambon JJ. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease. J Clin Periodontol 1985;12:1-20.

NOVA SOUTHEASTERN UNIVERSITY

Office of Grants and Contracts

Institutional Review Board

PARECER

Para: Dra. Bianca Flora

HPD – Faculdade de Odontologia

De: Ronald Needleman, Ph.D.

Chefe, Institutional Review Board

Data: 29 de julho de 2004

**Referente a: *O papel das proteínas salivares no desenvolvimento da doença periodontal* –
Protocolo de Pesquisa nº HPD-DEN05170206X**

Eu revisei a aplicação para Continuação/Renovação da pesquisa descrita acima. Por parte do Institutional Review Board (IRB) da Nova Southeastern University (NSU), o projeto *O papel das proteínas salivares no desenvolvimento da doença periodontal* está aprovado por um ano. Como investigadora principal, você deve obedecer aos seguintes requisitos:

- 1) Consentimento: Os formulários de consentimento devem indicar a aprovação e sua data. Os formulários devem ser desenvolvidos de maneira que sejam claramente compreendidos pelos sujeitos. Os sujeitos devem receber uma cópia assinada do documento de consentimento e uma cópia deve ser colocada no arquivo confidencial do sujeito.
- 2) Reações adversas: A investigadora principal deve notificar o chefe do IRB sobre quaisquer reações adversas que podem acontecer como resultado deste estudo. A aprovação pode ser retirada se o problema for sério.
- 3) Comentários: Quaisquer mudanças no estudo (ex. procedimentos, formulários de consentimento, investigadores etc) devem ser aprovadas pelo IRB antes da implementação.
- 4) Relatórios: Um relatório (relato do progresso) deve ser submetido pelo menos uma vez por ano.

O IRB da NSU está de acordo com os requisitos para a proteção dos sujeitos de acordo com a Parte 46 do Título 45 do Código de Regulações Federais (45 CFR 46) revisado em 18 de junho de 1991.

c/c: Dr. Arthur DeCarlo.

NOVA SOUTHEASTERN UNIVERSITY
Office of Grants and Contracts
Institutional Review Board

MEMORANDUM

To: Dr. Bianca S. Flora
HPD-College of Dental Medicine

From: Ronald Needleman, Ph.D.
Chair, Institutional Review Board

Date: July 29, 2004

Re: *The Role of Salivary Proteins in the Development of Periodontal Disease* -
Research Protocol No. HPD-DEN05170206X

I have reviewed the Continuation/Renewal Application for the above-referenced research protocol by an expedited procedure. On behalf of the Institutional Review Board of Nova Southeastern University, "*The Role of Salivary Proteins in the Development of Periodontal Disease*" is approved for one year. As principal investigator, you must adhere to the following requirements:

- 1) CONSENT: The consent forms must indicate the approval and its date. The forms must be administered in such a manner that they are clearly understood by the subjects. The subjects must be given a copy of the signed consent document, and a copy must be placed with the subjects' confidential chart/file.
- 2) ADVERSE REACTIONS: The principal investigator is required to notify the IRB chair of any adverse reactions that may develop as a result of this study. Approval may be withdrawn if the problem is serious.
- 3) AMENDMENTS: Any changes in the study (e.g., procedures, consent forms, investigators, etc.) must be approved by the IRB prior to implementation.
- 4) CONTINUING REVIEWS: A continuing review (progress report) must be submitted at least once each year.

The NSU IRB is in compliance with the requirements for the protection of human subjects prescribed in Part 46 of Title 45 of the Code of Federal Regulations (45 CFR 46) revised June 18, 1991.

Cc: Dr. Arthur DeCarlo

O papel das proteínas salivares (Histatinas) no desenvolvimento da doença periodontal

Apoio financeiro: Divisão de Profissões da Saúde, Nova Southeastern University
Aprovação IRB # HPD-DEN05170206X – Data de aprovação: 29 de julho de 2004.

Principal investigadora:
Bianca S. Flora
Nova Southeastern University
College of Dental Medicine
Department of Periodontology
3200 South University Dr.
Ft. Lauderdale, FL 33328
bflora@nova.edu (954) 262-1919

Co-investigadora:
Luciana M. Safioti
Nova Southeastern University
College of Dental Medicine
Department of Periodontology
3200 South University Dr.
Ft. Lauderdale, FL 33328
lusafioti@hotmail.com (954) 262-1919

Institutional Review Board
Office of Grants and Contracts
Nova Southeastern University
(954) 262-5369

Descrição do Estudo:

Este estudo envolve uma pesquisa na qual estamos investigando se pacientes com doença periodontal possuem a mesma quantidade de uma proteína antimicrobiana (histatina) na saliva comparados com pacientes sem doença periodontal. Nós mediremos também os níveis de certas enzimas em sua saliva. O Sr./Sra. foi selecionado como participante com base em sua condição gengival. Se o Sr./Sra. concordar em participar, o Sr./Sra. irá doar saliva na sua consulta inicial, antes do tratamento periodontal, e após o término do seu tratamento periodontal. A duração esperada da sua participação é de três meses.

Dois tipos de secreções salivares serão coletadas do Sr./Sra. Para a coleta do primeiro tipo (glândula parótida), um instrumento plástico será posicionado na saída da sua glândula salivar (na parte de dentro da sua bochecha) e sua saliva será estimulada por balas amargas. O segundo tipo de saliva (total) será coletado simplesmente por cuspir em um tubo. A coleta das amostras salivares não levará mais de 30 minutos mas deve começar aproximadamente às 13:00 horas. Em seguida o Sr./Sra. continuará com seu tratamento dentário fornecido pelo seu estudante e professor.

Riscos/Benefícios ao Participante:

Nós não antecipamos nenhum efeito negativo decorrente da sua participação no estudo. Pode haver um risco mínimo de o Sr./Sra. se engasgar com sua própria saliva ou com as balas amargas.

Não há benefícios diretos ao Sr./Sra., entretanto, os resultados desta pesquisa pode trazer como benefício a compreensão da progressão de sua doença periodontal e pode possivelmente levar ao desenvolvimento de novos procedimentos para o tratamento desta doença no futuro.

Se o Sr./Sra. tiver preocupações sobre os riscos ou benefícios em participar neste estudo, o Sr./Sra. pode entrar em contato com a Dra. Flora, Dra. Safioti ou o escritório de Ética em Pesquisa nos números indicados acima.

Custos e pagamentos ao Participante

Não existem custos ou pagamentos feitos ao Sr./Sra. por participar neste estudo. Entretanto, nós gostaríamos de compensar a doação das amostras salivares. Nós iremos providenciar sua primeira consulta de manutenção periodontal (após o término do seu tratamento periodontal) sem custo algum para o Sr./Sra.

Confidencialidade e Privacidade

Toda informação obtida neste estudo é estritamente confidencial a menos que o acesso seja requerido por lei. Você terá um número no estudo e este número, em vez do seu nome, será registrado nas avaliações que você receber. As avaliações serão armazenadas em arquivos na Universidade para garantir segurança e privacidade. Seu nome não será utilizado em publicações ou apresentações em conferências. Desta forma, seu nome será protegido.

Uso de Informação Protegida sobre Saúde

Este estudo não requer acesso a nenhuma Informação Protegida sobre Saúde.

Direito do Participante de se Retirar do Estudo

O Sr./Sra. tem o direito de recusar a participar ou se retirar a qualquer momento. Se o Sr./Sra. se retirar, isto não afetará seu tratamento na Universidade de forma alguma. Se o Sr./Sra. escolher se retirar, o Sr./Sra. poderá solicitar que qualquer informação que tenha sido coletada seja destruída a menos que proibida por lei federal ou estadual.

Outras Considerações

Se alguma informação nova sobre o estudo que possa estar relacionada a sua vontade de continuar a participar se tornar disponível, esta informação será fornecida ao Sr./Sra. pela Dra. Flora ou pela Dra. Safioti.

Consentimento Voluntário pelo Participante:

Eu li o presente Formulário de Consentimento, ou este foi lido para mim, e eu entendo completamente o conteúdo deste documento e voluntariamente aceito participar. Todas as minhas questões relacionadas à pesquisa foram respondidas. Eu concordo em participar neste estudo de pesquisa. Se eu tiver perguntas no futuro sobre este estudo elas serão respondidas pela Dra. Flora e a Dra. Safioti. Uma cópia deste formulário foi dada para mim. Este consentimento termina na conclusão deste estudo.

Assinatura do Participante:_____ Data:_____

Representante Autorizado:_____ Date_____

Autoridade do Representante baseada em:_____

Assinatura da Testemunha:_____ Date: _____

Informed Consent

The Role of Salivary Proteins (Histatins) in the Development of Periodontal Disease

Funding Source: Health Professions Division Research Grant, Nova Southeastern University.
IRB approval # HPD-DEN05170206X - Approval Date: July 29, 2004.

Principal investigator:

Bianca S. Flora, DDS., DSc.
Nova Southeastern University
College of Dental Medicine
Department of Periodontology
3200 South University Dr.
Ft. Lauderdale, FL 33328
bflora@nova.edu (954) 262-1919

Co-investigator:

Luciana M. Safioti, DDS.
Nova Southeastern University
College of Dental Medicine
Department of Periodontology
3200 South University Dr.
Ft. Lauderdale, FL 33328
lusafioti@hotmail.com (954) 262-1919

Institutional Review Board
Office of Grants and Contracts
Nova Southeastern University
(954) 262-5369

Description of the Study:

This study involves a research in which we are experimentally investigating if patients diagnosed with periodontal disease have the same amount of an antimicrobial protein (histatin) in their saliva as patients with no periodontal disease. We will also measure levels of certain enzymes in your saliva. You have been selected as a participant based on your periodontal condition. If you agree to participate, you will donate saliva at your initial appointment, prior to periodontal treatment, and after completion of your periodontal treatment. The expected duration of your participation is 3 months. Two types of salivary secretions will be collected from you. In the first one (parotid gland), a plastic device will be held at the exit of your salivary gland (inside your cheek) and salivary flow will be stimulated by chewing sour candies. The second type of saliva (whole) will be collected simply by spitting into a tube. The collection of the salivary samples will take no more than 30 min but it must start at approximately 1:00 p.m. You will then continue with your standard dental care, under the guidance of your assigned student and faculty.

Risks /Benefits to the Participant:

We do not anticipate you experiencing any negative effects as a result of your participation in the study. There may be a minimum risk of choking with your own saliva or the sour candies. There are no direct benefits for you but the results of this research may bring as benefit the further understanding of the progression of your periodontal disease and may possibly lead to the development of new approaches for treatment of this disease in the future.

If you have any concerns about the risks or benefits of participating in this study, you can contact Dr. Flora, Dr. Safioti or the IRB office at the numbers indicated above.

Costs and Payments to the Participant

There are no costs to you or payments made for participating in this study. However, we would like to compensate you for donating the salivary samples. We will thus be providing your first maintenance treatment (after the completion of your periodontal treatment) with no

cost to you.

Confidentiality and Privacy

All information obtained in this study is strictly confidential unless disclosure is required by law. You will be assigned a study number, and this number, rather than your name, will be recorded on the assessments you receive. The assessments will be stored in files inside the University to ensure security and confidentiality. Your name will not be used in the reporting of information in publications or conference presentations. Thus your anonymity and confidentiality will be protected.

Use of Protected Health Information (PHI)

This study does not require the disclosure of any Protected Health Information.

Participant's Right to Withdraw from the Study

You have the right to refuse to participate or withdraw at any time. If you do withdraw, it will not effect your treatment at the medical center in any way. If you choose to withdraw, you may request that any data which has been collected will be destroyed unless prohibited by state or federal law.

Other Considerations

If significant new information relating to the study becomes available which may relate to your willingness to continue to participate, this information will be provided to you by Dr. Flora and Dr. Safioti.

Voluntary Consent by Participant:

I have read the preceding consent form, or it has been read to me, and I fully understand the contents of this document and voluntarily consent to participate. All of my questions concerning the research have been answered. I hereby agree to participate in this research study. If I have any questions in the future about this study they will be answered by Dr. Flora and Dr. Safioti. A copy of this form has been given to me. This consent ends at the conclusion of this study.

Participant's Signature:_____ Date:_____

Authorized Representative_____ Date_____

Authority of Representative is based on:_____

Witness's Signature:_____ Date: _____

APÊNDICE C – Resultados das quantidades de histatinas 1, 3 e 5 nas amostras salivares de sujeitos do grupo saúde e do grupo doença a partir das áreas de pico dos cromatogramas

Sujeitos da Pesquisa	Área de Pico	Área de Pico	Área de Pico
	Histatina 1	Histatina 3	Histatina 5
Grupo Saúde			
A	66487.94	115885.12	317221.53
A-2	62372.01	118345.18	324747.94
B	70070.61	62471.99	219960.06
B-2	65804.71	60147.41	201307.23
C	22779.21	30777.75	130978.02
C-2	24445.56	31002.71	132467.34
D	50949.08	78516.78	262722.53
D-2	43817.05	73317.35	258004.14
E			
E-2			
F	8481.79	15962.21	44266.96
F-2	8548.45	12056.15	33593.89
G	15497.21	19729.75	53606.94
G-2	16055.43	18230.03	52632.11
H	203746.36	250700.01	528676.12
H-2	207728.97	299803.91	554040.75
I	5415.68	983.15	13445.51
I-2	5932.26	824.85	11817.62
J			
J-2			
K	29736.26	4133.33	20500.11
K-2	16995.17	4683.33	19883.33
L			
L-2			
M	372164.3	112100	461208.4
M-2	361635.5	110943.1	480022.8
N			
N-2			
O			
O-2			
P	88889.17	9675	404000.1
P-2	91916.16	10591.67	438416.6
Q			
Q-2			
R			
R-2			
S			
S-2			
T	40666.66	40324.98	150816.7
T-2	117706.1	91916.67	203566.7
	Área de Pico	Área de Pico	Área de Pico

continua

conclusão

Grupo Doença	Histatina 1	Histatina 3	Histatina 5
1	11464.58	11889.51	67407.81
1-2	27278.38	27677.82	112913.44
2	34117.12	24128.96	182358.58
2-2	6465.49	6115.56	62208.61
3	130984.66	170685.81	340346.78
3-2	117445.36	151072.01	317880.41
4	60089.09	212418.31	244148.16
4-2	75536.29	249692.72	277110.38
5	207695.66	149774.89	374267.59
5-2	178734.23	109246.85	301712.09
6	53756.93	86996.24	266132.31
6-2	68279.27	99448.62	300153.41
7	77111.02	264518.66	293455.06
7-2	65546.44	170077.43	215111.01
8	560857.01	529437.25	1389813.6
8-2	545118.81	546686.75	1396416.8
9	163578.62	89617.07	374653.31
9-2	71478.71	44958.51	67321.16
10	16263.73	14138.31	47826.73
10-2	9948.19	9273.32	29669.62
11	78344.12	72486.84	255694.58
11-2	61638.82	53456.96	129449.13
12	16438.68	10964.68	64463.31
12-2	22462.58	14972.28	60389.04
13	47458.05	62796.94	163612.05
13-2	37595.78	56781.36	152763.56
14	100615.07	184199.91	399827.03
14-2	92866.49	163670.31	347261.97
15	150422.67	245847.05	371978.72
15-2	151230.89	269501.09	407319.97
16	92066.62	188832.39	305252.94
16-2	101348.44	209410.73	338239.09
17	252079.38	157004.84	423097.62
17-2	259552.89	171076.55	437647.59
18	119844.91	168636.06	317723.94
18-2	106955.61	140707.81	265639.53
19	3899.29	5748.96	42558.95
19-2	2066.96	4104.17	27478.34
20	71886.95	124877.32	207120.72
20-2	96632.46	104930.96	141536.91

ANEXO A – Cromatograma de um sujeito da pesquisa do Grupo Saudável mostrando áreas de pico para as histatinas 1, 3 e 5 pela análise da amostra por cromatografia líquida de alta pressão.

ANEXO B – Teste de Kolmogorov-Smirnov para a histatina 1 nos Grupos Saúde e Doença

Variável – Histatina 1

Variável	Amostra	Média	Desvio padrão
Grupo=1	12	166486,8	209503,4
Grupo=2	20	217357,8	244722

Teste de Kolmogorov-Smirnov

Hipótese Alternativa	Rejeitar Hipótese Nula se Maior que	Teste com Valor Alpha	Decisão (Teste Alpha)	Nível de Probabilidade
D(1)<>D(2)	0,4667	0,050	Aceitar Ho	0,5064
D(1)<D(2)	0,4667	0,025	Aceitar Ho	
D(1)>D(2)	0,4667	0,025	Aceitar Ho	

ANEXO C – Teste de Kolmogorov-Smirnov para a histatina 3 nos Grupos Saúde e Doença

Variável – Histatina 3

Variável	Amostra	Média	Desvio padrão
Grupo=1	12	131093,5	154787,8
Grupo=2	20	268893,1	248488,3

Teste de Kolmogorov-Smirnov

Hipótese Alternativa	Rejeitar Hipótese Nula se Maior que	Teste com Valor Alpha	Decisão (Teste Alpha)	Nível de Probabilidade
D(1)<>D(2)	0,4667	0,050	Aceitar Ho	0,1148
D(1)<D(2)	0,4667	0,025	Aceitar Ho	
D(1)>D(2)	0,4667	0,025	Aceitar Ho	

ANEXO D – Teste de Kolmogorov-Smirnov para a histatina 5 nos Grupos Saúde e Doença

Variável – Histatina 5

Variável	Amostra	Média	Desvio padrão
Grupo=1	12	426380,5	362271
Grupo=2	20	575998,1	571872,8

Teste de Kolmogorov-Smirnov

Hipótese Alternativa	Rejeitar Hipótese Nula se Maior que	Teste com Valor Alpha	Decisão (Teste Alpha)	Nível de Probabilidade
D(1)<>D(2)	0,4667	0,050	Aceitar Ho	0,5811
D(1)<D(2)	0,4667	0,025	Aceitar Ho	
D(1)>D(2)	0,4667	0,025	Aceitar Ho	

ANEXO E – Teste de Kolmogorov-Smirnov para o total de histatinas nos Grupos Saúde e Doença

Variável – Total de Histatinas

Variável	Amostra	Média	Desvio padrão
Grupo=1	12	723960,9	666821,3
Grupo=2	20	1062249	1040876

Teste de Kolmogorov-Smirnov

Hipótese Alternativa	Rejeitar Hipótese Nula se Maior que	Teste com Valor Alpha	Decisão (Teste Alpha)	Nível de Probabilidade
D(1)<>D(2)	0,4667	,050	Aceitar Ho	0,2635
D(1)<D(2)	0,4667	,025	Aceitar Ho	
D(1)>D(2)	0,4667	,025	Aceitar Ho	