

ANÁLISE DA SALIVA TOTAL DE PORTADORES DE FIBROSE CÍSTICA:
COMPOSIÇÃO INORGÂNICA E A ABORDAGEM PROTEÔMICA

LILIANI AIRES CANDIDO VIEIRA

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Cristina Barreto Bezerra
Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a. Gilvânia Coutinho Silva Feijó

Brasília - DF, 2008.

ANÁLISE DA SALIVA TOTAL DE PORTADORES DE FIBROSE CÍSTICA:
COMPOSIÇÃO INORGÂNICA E A ABORDAGEM PROTEÔMICA

LILIANI AIRES CANDIDO VIEIRA

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Cristina Barreto Bezerra
Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a. Gilvânia Coutinho Silva Feijó

Tese de Doutorado submetida à Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Grau de Doutor em Ciências da Saúde.

Brasília - DF, 2008.

Vieira, Liliani Aires Cândido.

Análise da salival de portadores de Fibrose Cística:
composição inorgânica e abordagem proteômica / Liliani Aires
Candido Vieira.

Brasília, 2008.

65 p.: il.

Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências da Saúde,
Universidade de Brasília, Brasília - DF.

É concedida à Universidade de Brasília permissão para reproduzir cópias desta Tese e emprestar ou vender tais cópias somente para propósitos acadêmicos e científicos. O autor reserva outros direitos de publicação e nenhuma parte desta Tese de doutorado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor.

Assinatura

“Se todos fossem iguais a você...que maravilha viver”
(Tom Jobim e Vinícius de Moraes)

*Amor, Incentivo, Coragem, Determinação, Desafio, Humildade, Franquesa,
Exemplos, Verdade, Bondade, Espiritualidade...*

*Apesar de tantas diferenças entre aqueles a quem dedico este trabalho, neles
encontrei tudo o que me motivou a fazê-lo... “Se todos fossem iguais a você que...
maravilha viver”*

Aos meus Pais, João e Celeste
Ao meu Marido Edson e meu Filho Miguel
Aos meus Sogros, Edson e Nórís
À minha Irmã Lilian
Às minhas Mestras, Ana Cristina B. Bezzera e Gilvânia Coutinho da S. Feijo

Dedico

AGRADECIMENTOS

Prof^a. Dr^a. Ana Cristina Barreto Bezerra
Universidade de Brasília
Faculdade de Ciências da Saúde - Departamento de Odontologia

Prof^a. Dr^a. Gilvânia Coutinho Silva Feijó
Universidade de Brasília - Faculdade de Planaltina - Curso de Ciências Naturais
Campus UnB de Planaltina

Prof. Dr. Sébastien Charneau
Universidade de Brasília
Departamento de Biologia Celular - Laboratório de Bioquímica e Química de proteínas

Dr^a. Izabela M. Dourado Bastos
Universidade de Brasília
Laboratório da Interação Parasito-Hospedeiro - Faculdade de Medicina,
Universidade de Brasília

Prof. Dr. Jaime M. Santana
Universidade de Brasília
Laboratório da Interação Parasito-Hospedeiro - Faculdade de Medicina,
Universidade de Brasília

Prof. Dr. Marcelo V. Sousa
Universidade de Brasília
Departamento de Biologia Celular - Laboratório de Bioquímica e Química de proteínas

Prof. Dr. Orlando Ayrton de Toledo
Universidade de Brasília
Faculdade de Ciências da Saúde - Departamento de Odontologia

Prof^a. Dr^a. Soraya Coelho Leal
Universidade de Brasília
Faculdade de Ciências da Saúde - Departamento de Odontologia

Prof. Dr. José Nicolau
Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia - Departamento de Materiais Dentários

Prof. Dr. Luiz Fabrício Zara
Universidade Católica de Brasília
Laboratório de Espectrometria Atômica Aplicada

Prof. Dr. Carlos Frederico de Souza Castro
Departamento de Ensino de Graduação
Centro Federal de Educação Tecnológica de Rio Verde

Igor Cardoso Pescara
Universidade Católica de Brasília
Laboratório de Espectroscopia Atômica Aplicada (TC)
Mestrando em Química Analítica

Tatiana Baptista Alves
Hospital da Universidade Católica de Brasília
Grupo de Saúde e Meio Ambiente (TC)

Luciana Ferreira Fortunato
Presidente da AGAFibro - Associação Goiana de Apoio ao Fibrocístico

Cecília Azevedo e Família

Deinnis Nagnner da Silva

Eciloane de Aquino Pereira

Este estudo teve apoio multidisciplinar junto ao Projeto de Beneficência e Assistência Social em Fibrose Cística da Universidade Católica de Brasília.

Foi desenvolvido nos laboratórios:

Laboratório de Espectroscopia Atômica Aplicada do Hospital da Universidade Católica de Brasília

Laboratório da Interação Parasito-Hospedeiro - Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília

Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas - Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília

Apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

“Por que não pudemos...? Jesus lhes respondeu: É por causa da vossa incredulidade. Porque eu v^o-lo digo em verdade: se tivésseis fé como um grão de mostarda, diríeis a esta montanha: Transporta-te daqui, e ela se transportaria, e nada vos seria impossível.”
(São Matheus, cap XVII, v de 14 a 20)

Foram muitos e muitos dias antevendo este momento, nunca imaginando um fim, mas sim a conclusão de mais uma etapa de vida. Vida na qual encontrei vários obstáculos mas que me proporcionou uma família, pessoas amigas, a certeza e a confiança de que somos capazes de realizar grandes coisas com dedicação e perseverança.

Sinto-me privilegiada pelo conhecimento adquirido que me ajuda a ajudar o próximo, a proporcionar saúde e a prevenir doenças. Tenho a fé que me impulsiona a seguir o meu caminho buscando concretizar ações que resultem no bem comum. A fé calma e a perseverante, que afugenta os momentos de hesitação e incerteza e sinaliza força e confiança.

A confiança que senti naqueles que acreditaram em mim. Nas mães que colaboraram com este trabalho, mesmo sabendo que não resultaria em benefício de seus filhos, mas que acreditam na vida e lutam corajosamente pela vida deles.

A confiança dos que me ajudaram, me orientaram, me receberam em seus lares, me mostraram os caminhos e colocaram ao meu alcance todo o seu conhecimento.

Em alguns momentos foi preciso discernir entre fé e presunção, combater a prepotência, buscar a humildade e colocar a fé em Deus acima da fé em mim mesma. Em outros, foi difícil mantê-la forte e ativa, pois muitas dúvidas surgiram e provocaram desestímulo e incredulidade. Mas em todos eles, contagiei-me pela vontade de viver com os portadores de Fibrose Cística que participaram desta pesquisa, alguns in memórium, e aprendi agradecer cada momento de minha vida.

Durante o período de execução desse trabalho, fui abençoada com a oportunidade de gerar uma vida e conscientizei-me da enorme responsabilidade do papel de mãe.

Tenho certeza que minha fé tornará essa tarefa prazerosa e gratificante, pois essa luz gerada através de mim me preenche de um amor inexplicável.

Por tudo isso e a todos agradeço.

Aos meus Mestres do Departamento de Odontopediatria da FOB-USP, aos meus Mestres da Universidade de Brasília, aos meus colegas da Faculdade de Odontologia da UFG e a todos os meus amigos, que, cada um do seu jeito, doou um pouco de si e me ajudou a compreender diferentes facetas da vida, a importância do conhecimento e o valor de uma amizade verdadeira.

São muitas as pessoas que eu deveria nomear aqui e que, em momentos distintos, dedicaram seu tempo me animando ou escutando meus desabafos, aguentaram meu mau humor e me ofereceram um ombro amigo. A todas elas agradeço do fundo de minha alma.

Algumas outras, todavia, tiveram uma participação direta e efetiva na execução deste trabalho. A elas, o meu profundo reconhecimento e gratidão.

Lista de Figuras

	Tese	
Figura 1	Classificações das mutações no gene <i>CFTR</i>	4
	Artigo I	
Figura 1	Apresentação de componentes principais em dois grupos distintos	25
	Artigo II	
Figura 1	Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE15%)	40
Figura 2	IEF ph 3-10, seguido de SDS-PAGE 12%	41
Figura 3	<i>Peptide Mass Fingerprinting (PMF)</i>	43

Lista de Quadros

	Tese	
Quadro 1	Principais componentes inorgânicos da saliva	11
Quadro 2	Principais componentes orgânicos da saliva	13

Lista de Tabelas

	Tese	
Tabela 1	Mutações encontradas nas diferentes classes	4
	Tabelas Artigo I	
Tabela 1	Parâmetros operacionais do espectrômetro de massas <i>ICP-MS</i>	22
Tabela 2	Parâmetros operacionais do espectrômetro de emissão óptica <i>ICP-OES</i>	22
Tabela 3	Parâmetros operacionais do espectrômetro absorção atômica AAS	22
Tabela 4	Programa de aquecimento para digestão de saliva em forno de microondas com radiação focalizada	23
Tabela 5	Média e desvio padrão (Dp) da concentração de cada elemento nos dois grupos	24
Tabela 6	Elementos com diferença estatística significativa entre os grupos ($p < 0,05$) ANOVA	25
Tabela 7	Elementos predominantes na Análise de Componentes Principais, em CP1	25
	Tabelas Artigo II	
Tabela 1	<i>Spot</i> excisado e a proteína identificada por <i>MS/MS</i>	43
	Tabelas Artigo III	
Tabela 1	Parâmetros operacionais do espectrômetro de massas ICP-MS	55
Tabela 2	Parâmetros operacionais do espectrômetro de emissão óptica <i>ICP-OES</i>	56
Tabela 3	Parâmetros operacionais do espectrômetro de absorção atômica AAS	56
Tabela 4	Programa de aquecimento para digestão de saliva em forno de microondas com radiação focalizada	56
Tabela 5	Concentração (média) e limite de detecção de elementos traço encontrado na saliva total estimulada de crianças saudáveis idade entre 5 e 12 anos	57

Lista de abreviaturas e siglas

FC	Fibrose Cística
CFTR	<i>Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator</i>
CFMDB Statistics	<i>Cystic Fibrosis Mutation Database Statistics</i>
ICP-MS	Espectroscopia de Massa com Plasma de Argônio Acoplado Indutivamente
ICP-OES	Espectroscopia de Emissão Óptica com Plasma de Argônio Acoplado Indutivamente
AAS	Espectroscopia de Absorção Atômica
EM	Espectrometria de Massa
IPG strip	<i>Immobilized pH Gradients strip</i>
MALDI-TOF	<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization–time of flight</i>
NCBI	Base de Dados não-redundante do <i>National Center for Biotechnology Information</i>
NCBI	Base de Dados do <i>National Center for Biotechnology Information</i>
LEAA	Laboratório de Espectroscopia Atômica Aplicada
HUCB	Hospital da Universidade Católica de Brasília
UNB	Universidade de Brasília
ANOVA	Análise de Variância
PCA	Análise de Componentes Principais
CPs	Componentes Principais
NPD	<i>Nasal Potential Difference</i>
SIDA	Síndrome da Imuno Deficiência Adquirida
IRT	Tripsinogênio Imunorreativo
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
AMPc	Adenosina Monofosfato Cíclico
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
PAGE	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida
2D	Eletroforese Bidimensional
Ig	Imunoglobulina
IgA	Imunoglobulina A
IgAs	Imunoglobulina A secretora
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
Pa	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
pSS	Síndrome de Sjögren Primária
HNO ₃	Ácido nítrico
HCl	Ácido clorídrico
Tris	Tampão Tris
ΔF	Delta F

Lista de Símbolos

L	Litro
cm	Centímetros
mm	Milímetro
mg	Miligrama
mL	Mililitro
%	Porcentagem
v	Volume
h	Hora
kW	Quilowatt
V	Voltagem
kPa	Quilopascal
kDa	Quilodalton
nm	Nanômetro
min	Minuto
W	<i>Watt</i>
°C	Grau Celsius
®	Marca registrada
™	<i>Trade Mark</i>
Dp	Desvio Padrão
kg	Quilograma
N	Normal
mM	Milimol
pH	Potencial Hidrogeniônico
Mr	Massa Molecular Relativa
pI	Ponto Isoelétrico
Al	Alumínio
As	Arsênio
B	Boro
Ba	Bário
Ca	Cálcio
Cd	Cádmio
Co	Cobalto
Cr	Cromo
Cu	Cobre
Fe	Ferro
Hg	Mercúrio
K	Potássio
Mg	Magnésio
Mn	Manganês
Mo	Molibdênio
Na	Sódio
Ni	Níquel
Pb	Chumbo
Se	Selênio
Si	Silício
Sr	Estrôncio
Ti	Titânio
V	Vanádio
Zn	Zinco
Cl	Cloro

RESUMO

A Fibrose Cística (FC) é uma doença hereditária autossômica, recessiva e letal que apresenta certas dificuldades na realização do diagnóstico precoce e preciso. Devido ao comprometimento patológico essa doença assume grande importância e o diagnóstico precoce é decisivo para um melhor prognóstico. Este estudo teve por objetivo determinar a composição inorgânica e análise proteômica da saliva total de indivíduos com FC e identificar biomarcadores para uso no diagnóstico da doença.

Foram coletadas amostras de saliva de habitantes da região Centro Oeste do Brasil: 12 indivíduos homocigotos para a mutação $\Delta F 508$ (4 mulheres, 8 homens), 12 heterocigoto para $\Delta F 508$ (5 mulheres, 7 homens), 13 indivíduos com FC com mutações não identificadas (6 mulheres, 7 homens), 8 indivíduos com diagnóstico duvidosos para FC (5 mulheres, 3 homens) e 43 indivíduos saudáveis (23 mulheres e 20 homens). Indivíduos com dúvida no diagnóstico para FC ou que não cumpriram os requisitos para compor o grupo controle foram excluídos das análises. Os teores dos elementos traço Al, As, B, Ba, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, K, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, Pb, Se, Si, Sr, Ti, V e Zn na saliva foram avaliados por espectrometria de massa com plasma de argônio acoplado indutivamente (ICP-MS), espectrometria de emissão óptica com plasma de argônio acoplado indutivamente (ICP-OES) e espectrometria de absorção atômica (AAS). O perfil proteico foi estudado por eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de *Sodium Dodecyl Sulfate* (SDS-PAGE), por eletroforese bidimensional (2-DE) e análise de bases peptídicas por espectrometria de massa (MS/MS).

Os elementos Na e K apresentaram, em média, teores mais elevados, enquanto, V, Cr e Se menos elevado quando comparados a indivíduos saudáveis, o elemento As foi detectado apenas no grupo de indivíduos saudáveis ($p < 0,05$). Nas análises por eletroforese, o grupo com FC apresentou uma banda nítida de massa molecular de 38 kDa, não visualizada nos indivíduos sem a doença. A espectrometria de massa identificou a uma imunoglobulina (IgA), a qual esta visivelmente expressa nos indivíduos com FC.

Existe diferença significativa entre a saliva de indivíduos com FC e às de indivíduos saudáveis. Foi também identificado diferenças no perfil proteico. Com os resultados deste trabalho podemos inferir que a saliva total estimulada é uma fonte potencial para estudos que possam corroborar no desenvolvimento de um método de diagnóstico precoce e preciso da FC.

PALAVRAS-CHAVE: Fibrose Cística; saliva; íons salivares; biomarcadores; proteínas.

Abstract

Cystic Fibrosis (CF) is an autosomal recessive lethal inherited disease that presents certain difficulties for an early and accurate diagnosis. Due to its pathological character this disease assumes great importance and early diagnosis is of paramount importance for a good prognosis. The objective of this study was to determine the inorganic composition and the proteomic analysis of stimulated whole saliva obtained from CF and identify biomarkers for CF diagnosis.

Samples were collected from individuals living in the Brazilian West Central Region: 12 homozygous for mutation $\Delta F 508$ (4 females; 8 males); 12 heterozygous for mutation $\Delta F 508$ (4 females; 8 males); 13 with unidentified CF mutations (6 females; 7 males); 8 with doubtful CF diagnosis (5 females; 3 males); and 43 healthy individuals (23 females; 20 males) for the control group. Samples from individuals with doubtful diagnosis as well as from those that did not fulfill the basic requirements to compose the control group were discarded. Concentration of trace elements Al, As, B, Ba, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, K, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, Pb, Se, Si, Sr, Ti, V e Zn were evaluated using mass spectrometer with inductively coupled argon plasma (ICP-MS), optical emission spectrometer with inductively coupled argon plasma (ICP-OES), and atomic absorption spectrometer (AAS). Protein profile was accessed by polyacrylamide gel electrophoresis 15% in presence of Sodium Dodecyl Sulfate (SDS-PAGE), by bidimensional electrophoresis (2D), and analysis of the peptide bases by mass spectrometry (MS)

In every analyses, results obtained for CF individuals were compared to those for healthy subjects. Average concentration values for Na and K were higher in CF patients as compared to healthy individuals. In contrast, V, Cr, and Se, were lower. Element As was detected only in the healthy group ($p < 0,05$). In the SDS-PAGE analysis CF patients presented a distinct band with molecular mass between 30 and 45 kDa not visualized in the healthy subjects. By 2D electrophoresis associated with mass spectrometry it was possible to identify a heavy chain immunoglobulin (C region) of IgA (IgA) clearly visible in CF patients.

There were significant differences between saliva from healthy and CF individuals as well as in their protein profile. Results obtained in the present study indicate that stimulated whole saliva is a potential source for studies that may corroborate the development of an early and accurate screening method.

Key words: Cystic Fibrosis; saliva; salivary ions; biomarkers; proteins.

Sumário

Lista de figuras	i
Lista de quadros	i
Lista de tabelas	ii
Lista de abreviaturas e siglas	iii
Lista de Símbolos	iv
Resumo	v
Abstract	vi
Introdução	1
-Fibrose cística	1
O diagnóstico	5
-Saliva	8
Composição inorgânica	9
Composição orgânica	12
Hipóteses	14
Objetivos	14
Objetivo geral	14
Objetivos específicos	14
Artigo I - Elementos traço na saliva total de indivíduos com Fibrose Cística	15
Artigo II - Análise da saliva total de crianças com Fibrose Cística: uma abordagem proteômica	32
Artigo III – Caracterização de elementos traço na saliva total estimulada de crianças saudáveis	49
Considerações Gerais e Perspectivas.....	61
Referências	62

INTRODUÇÃO

A Fibrose Cística (FC) torna-se relativamente freqüente se somarmos a incidência das quase 1600 mutações, acometendo indivíduos homocigotos, heterocigotos e portadores de mutações no gene *cystic fibrosis transmembrane regulator* (*CFTR*). É mais comum em caucasianos e sem história de FC na família a chance de ser portador da doença é de 1 em 25 (Heller, 2005). Estudos clínicos e moleculares se combinam com a finalidade de atingir uma melhor compreensão da fisiopatologia e da bioquímica da FC com vistas ao desenvolvimento de um tratamento que recupere a expressão correta do gene ou que regule o sistema de transporte de íons. Terapia genética ainda não está disponível, sendo comumente indicado o tratamento pré-sintomático, para minimizar infecções pulmonares e controlar deficiências enzimáticas (Cabello, 2008). O diagnóstico precoce tem sido determinante na eficácia do tratamento, contribuindo para melhorar a qualidade de vida e a sobrevivência do paciente. É importante que os clínicos estejam preparados para o diagnóstico que envolve além dos testes disponíveis, um bom conhecimento dos sinais, sintomas clínicos e história familiar progressiva. Isso tem motivado à busca de alternativas viáveis e simples para o diagnóstico precoce.

A *CFTR* é essencial para o transporte de íons através da membrana celular, estando envolvida na regulação de fluxo de Cl, Na e água (Ribeiro et al, 2002).

Este trabalho baseia-se no pressuposto de que portadores de FC possuem alteração na composição salivar devido à alteração no transporte de Cl e Na. Pouco se sabe sobre a composição salivar e correlações com a bioquímica e o diagnóstico da doença. Esse conhecimento pode ser usado para melhor elucidação da FC.

Fibrose Cística

A FC, ou mucoviscidose, é uma doença autossômica recessiva, letal, com freqüência estimada variando entre 1/2000 e 1/3000 nascimentos de caucasianos em vários países (Heller, 2005; Davies, 2006) e menos freqüente entre negros e asiáticos (ABRAM, 2008). É causada por mutações no gene *CFTR*, identificado e clonado em 1989, está situado no cromossomo 7q31.2 (Mishra et al, 2006) e codifica uma glicoproteína transmembrana, que atua no transporte eletrolítico na membrana

apical de células epiteliais, funcionando como um canal de cloreto dependente da adenosina monofosfato cíclico (AMPC) (Sermert-Gaudelus et al, 2006). Uma deleção de três pares de bases, resultando na ausência do aminoácido fenilalanina na posição 508 da proteína, mutação comumente designada $\Delta F508$, está presente em cerca de 70% dos indivíduos com FC (Davies, 2006). Atualmente na *Cystic Fibrosis Mutation Database Statistics (CFMDB Statistics)*, apenas o estudo de Raskim et al (1993), aborda estatisticamente a ocorrência na população brasileira das 24 mutações mais comuns na FC, onde a mutação $\Delta F508$ foi encontrada em 47% dos casos.

A seguir é apresentada parte de uma descrição histórica dos maiores achados na pesquisa da FC, como descrita por RIBEIRO et al (2002).

- Séc. XVIII Folclore Europeu: Crianças com suor salgado morriam precocemente
- 1938: Dorothy Andersen descreveu as características clínicas, anatomopatológicas e epidemiológicas da FC
- 1955: Foi criada, nos EUA, a *Cystic Fibrosis Foundation*.
- 1959: Padronização do teste do suor por Gibson & Cooke, padrão áureo para o diagnóstico da FC até hoje
- 1979: Crossley demonstrou o aumento, no sangue, da tripsina imunorreativa
- 1985: O gene responsável pela FC foi localizado
- 1989: O gene foi clonado e seqüenciado

Homens e mulheres caucasianos sem história de FC na família teriam 1 chance em 25 de serem portadores. Se ambos os pais são portadores, o aconselhamento genético deve mostrar que em cada gravidez existe 1 chance em 4 de nascer um filho com FC e 50% de chance de nascer um portador (Heller, 2005).

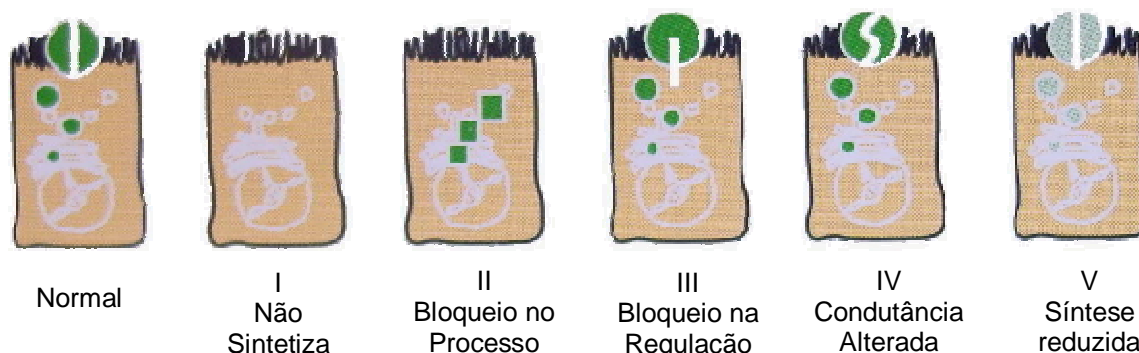
O resultado das mutações no gene CFTR é o transporte defeituoso de cloreto nas células. A redução ou eliminação da excreção de cloreto através do canal CFTR, provoca maior fluxo de íon sódio para preservar o equilíbrio eletroquímico e, consequentemente de água, por ação osmótica. Isso produz

secreções desidratadas e viscosas, associadas com obstrução, destruição e fibrose de vários ductos exócrinos (Ribeiro et al, 2002; Mishra et al, 2005).

Mishra et al (2005), relatam que mutações diferentes causam diferentes defeitos na produção e função da proteína e baseados em extensa revisão de literatura, descreveram a classificação das mutações em 6 classes:

- Classe I – defeito na síntese de proteína: Mutações nesta classe incluem os fenótipos de FC mais graves resultando em nenhuma proteína sintetizada.
- Classe II – defeito no processamento da proteína: Estas mutações resultam em uma proteína *CFTR* que não trafega para a localização celular correta devido ao mau dobramento da proteína.
- Classe III – mutação de regulamento defeituoso: Neste caso a proteína é produzida, trafega até a membrana da célula, mas não responde a estimulação da AMPc.
- Classe IV – condução defeituosa: O gene *CFTR* codifica uma proteína que trafega corretamente até a membrana da célula e responde à estímulos mas gera uma corrente de cloreto reduzida
- Classe V – quantidade reduzida: Estas mutações produzem uma quantidade reduzida e baixo nível de proteína funcional que é translocada para a membrana da célula.
- Classe VI – estabilidade reduzida da proteína: Esta classe de mutação foi introduzida recentemente e nela inclui mutações que causam o comprometimento da proteína *CFTR*.

As mutações do gene *CFTR* são consideradas severas ou brandas. Dependendo da maneira como a proteína funcional é afetada o transporte de cloreto não ocorre ou fica diminuído. Geralmente, mutações severas resultam na falha da síntese proteica ou no bloqueio do processo, e mutações brandas causam alteração na condutância ou a síntese reduzida da proteína. As variações do gene *CFTR* podem ser divididas em classes de acordo com a implicação fisiológica (Figura 1) (Mishra et al, 2005; Kerem & Kerem; 1996).



Adaptado de: Roche®, São Paulo, 2003.

Figura 1 – Classificações das mutações no gene *CFTR*

A Tabela 1 mostra as mutações encontradas com maior freqüência dentro de cada classe. De acordo com a literatura, outras mutações representam menos que 1% dos casos (Mishra et al, 2005; Mateu et al, 2002; Mesquita, 2001).

Tabela 1 – Mutações encontradas nas diferentes classes

Classe I	G542X
Classe II	?F 508, N1303K
Classe III	G551D, S1255P
Classe IV	R117H, R334W, R347P
Classe V	A455

A FC afeta as células epiteliais de vários órgãos e suas manifestações clínicas incluem: doença pulmonar obstrutiva crônica em quase todos os indivíduos afetados; insuficiência pancreática em 80% dos casos; íleo meconial em 17% dos recém-nascidos; *diabetes mellitus* associada à doença pancreática em 20% dos adultos; doença obstrutiva do trato biliar em 15% a 20% dos indivíduos; e azoospermia em mais de 90% dos homens afetados (Ribeiro et al, 2002; Davis & di Sant'Agnese, 1984; Sólis et al, 2007)

Os sintomas respiratórios surgem no primeiro ano de vida. Um muco espesso anula a função ciliar do epitélio brônquico e, pela obstrução das vias aéreas inferiores, criam-se condições propícias as infecções. Os indivíduos com FC são propensos a desenvolver colonizações no trato respiratório pelos microorganismos *Staphilococcus aureus* e *Haemophilus influenzae* nos estágios iniciais da doença e,

posteriormente, por *Pseudomonas aeruginosa* (Davies, 2006; Cannon et al, 2003). Alguns indivíduos têm sido colonizados por *Escherichia coli* e *Burkholderia cepacia*, sendo a infecção por este último, devido a sua resistência à maioria dos antibióticos conhecidos, o pior fator do prognóstico desses indivíduos (Davies, 2006).

As complicações gastrointestinais da FC incluem várias anormalidades digestivas e deficiências nutricionais, incluindo insuficiência pancreática, íleo meconial, síndrome de obstrução intestinal distal, doença hepática, dificuldade de manutenção da massa óssea, osteoporose precoce e *diabetes mellitus*, sendo o baixo peso corporal e a perda de massa óssea considerados os maiores problemas de adultos com FC (Mishra et al, 2005).

O íleo meconial, um acúmulo de muco viscoso que pode ser encontrado no intestino delgado de bebês, pode causar obstrução do intestino delgado e ser a mais precoce manifestação da FC (Bonucci & Neto, 2003; Schosield & Cotran, 1996).

As glândulas salivares estão frequentemente envolvidas com alterações histológicas, dilatação progressiva dos ductos, metaplasia escamosa do epitélio de revestimento e atrofia glandular seguida de fibrose (Schosield & Cotran, 1996).

Nos quarenta anos após as primeiras descrições da FC, ocorreram mudanças acentuadas no seu prognóstico. A média de vida dos indivíduos afetados aumentou para dez vezes mais e a qualidade de vida melhorou imensamente. Esse aumento na sobrevida tem sido atribuído a vários fatores, incluindo diagnóstico precoce, aperfeiçoamento na conduta nos casos de íleo meconial, melhor administração de dietas e complementação com enzimas pancreáticas, fisioterapia freqüente, desenvolvimento de potentes antibióticos e centros especializados de tratamento com abordagem multidisciplinar (Merelle et al, 2001).

Diagnóstico

Segundo Ribeiro et al (2002), por ordem de especificidade, o diagnóstico de FC deveria ser realizado: (1) pelo achado de duas mutações no gene FC, ou (2) por dois testes do suor alterados, ou (3) pela presença de pelo menos uma das seguintes manifestações clínicas: doença pulmonar obstrutiva / supurativa ou sinusal crônica; insuficiência pancreática exócrina crônica; história familiar de FC. Como métodos de triagem os autores citam: a triagem neonatal pelo método da tripsina

imunorreativa (IRT), ou a medida da diferença de potencial na mucosa nasal, método pouco difundido na rotina diagnóstica.

Análise genotípica (DNA)

A descoberta do gene da FC, na década de 80, trouxe melhor entendimento sobre a doença e proporcionou um novo método de diagnóstico. A análise da mutação genética é usada para: identificar o portador; para o diagnóstico pré-natal e gravidez de risco; e para programas de triagem neonatal (Mesquita, 2001).

Teste do suor

Gibson & Cooke (1959) *apud* Mishra et al (2005) desenvolveram o Teste do Suor que se tornou o padrão áureo para o diagnóstico da FC, com elevada sensibilidade e especificidade (Ribeiro et al, 2002; Mishra et al, 2005; CFF, 2006). O suor localizado é estimulado por iontoforese por pilocarpina. Uma corrente elétrica é aplicada sobre uma área selecionada na pele, por não mais que 5 minutos. A coleta pode ser feita usando gaze, filtro de papel ou um dispositivo coletor Wescor Macroduct[®]. Deve ser coletado em, no máximo, 30 minutos e em não menos que 20 minutos. Para assegurar maior precisão é requerida uma taxa de secreção de, no mínimo, 1g/m²/min. Volumes insuficientes de suor não devem ser misturados e, nesse caso, um novo teste deve ser feito, selecionando uma nova área para coleta do material. Para as análises de sódio e cloreto, respectivamente, os métodos colorimétrico (espectrofotometria) e espectrometria de absorção atômica são considerados aceitáveis (CFF, 2006).

O resultado é positivo quando a concentração de cloro é maior que 60 mmol/L. Os níveis considerados normais vão até 40 mmol/L. Adolescentes e adultos jovens podem ter valores mais elevados e, por isso, resultados entre 45 e 60 mmol/L são considerados duvidosos, devendo ser repetidos. Pela gravidade da doença e pelo seu prognóstico, o diagnóstico de FC somente poderá ser confirmado com dois testes positivos, realizados em momentos diferentes. Não existe correlação entre a concentração de íons no suor e a gravidade da doença (Ribeiro et al, 2002; CFF, 2006; Coakley et al, 2006).

Esse teste é seguro em aproximadamente 98% dos indivíduos com FC. Contudo, sua aplicação em bebês é mais difícil devido à coleta insuficiente de suor e

à elevada concentração de eletrólitos nas primeiras 24 horas de vida (Mishra et al, 2005). Por esse motivo, o teste do suor não é realizado em bebês com menos de duas semanas de idade ou pesando menos que 3 kg (Coakley et al, 2006).

Tripsinogênio imunorreativo (IRT)

A triagem neonatal para FC emprega a medida do tripsinogênio imunorreativo (IRT) (Southern & Littlewood, 2003; Southern, 2004). Entretanto, esse teste tem sido assunto de discussão, principalmente por causa de resultados controversos e das taxas observadas de falsos positivos (0,5%) e falsos negativos (até 20%) (Cabello, 2003). Apresenta, também, a desvantagem de ser um teste restrito aos dois primeiros meses de vida, devido à diminuição natural da concentração de tripsinogênio após o nascimento. Outro problema relacionado a resultados falso-negativos no IRT é que, provavelmente, os indivíduos com FC não detectados, não serão submetidos a outros testes, como, por exemplo, o de DNA (Mishra et al, 2005; Cabello, 2003, Santos et al, 2005). O IRT neonatal para FC consiste na coleta de uma gota de sangue sobre um filtro de papel nos primeiros dias após o nascimento e imunoanálise de tripsinogênio.

Diferença do potencial nasal (NPD)

A alteração no transporte de íons do epitélio respiratório de indivíduos com FC tem sido estudada *in vivo* pela medida da diferença do potencial na mucosa nasal. Segundo Davies (2006) a NPD pode ser útil para confirmar o diagnóstico naqueles indivíduos que apresentam o resultado do teste do suor duvidoso ou normal, porém com alto índice de suspeita. O NPD é um teste da função da *CFTR* significativamente mais complexo que o teste do suor (Mishra et al, 2005). Nesse teste é medido a milivoltagem gerada pelo movimento de íons através do epitélio. É convencionalmente mensurado no nariz, como um auxílio para o diagnóstico e no contexto de exames clínicos (Davies, 2006). Embora apresente resultados precisos em adultos, é necessário gerar e validar dados mensurados em bebês e crianças de tenra idade com FC em comparação com crianças saudáveis antes de implementá-lo como uma ferramenta para uso em casos duvidosos (Sermet-Gaudelus et al, 2006).

Saliva

A saliva é um líquido balanceado composto em mais de 99% de água e menos de 1% de sólidos, principalmente proteínas e eletrólitos. Cerca de 0,5 a 1,0 litro de saliva é secretado por dia pelas glândulas salivares, sendo que 85% a 90% dessa secreção tem origem nas glândulas salivares maiores e o restante, aproximadamente 10%, nas glândulas salivares menores. Esse fluido contribui para várias funções bucais, dentre elas, capacidade tampão, ação antibacteriana, mastigação, deglutição, fala, e lubrificação do epitélio (Fejerskov & Kidd, 2005).

As glândulas salivares são de natureza exócrina e localizam-se próximas à cavidade bucal, com três pares de glândulas maiores (submandibulares, parótidas e sublinguais) e várias glândulas menores, distribuídas pela mucosa bucal. A secreção salivar é controlada pelo sistema nervoso autônomo, embora vários hormônios possam também modular sua composição (Scully, 2003; Thylstrup & Fejerskov, 2001).

A unidade funcional de uma glândula salivar é o ácino, representando, em geral, 80% de sua massa. É composto por um aglomerado de células piramidais que secretam sua produção líquida para o interior de um ducto. As glândulas parótidas e submandibulares possuem um sistema de ductos bem desenvolvidos e ramificados. Em outras glândulas, alguns ductos apresentam-se esparsamente distribuídos ou até mesmo ausentes (Ross, 1993).

Cada glândula maior secreta um produto diferente: a parótida produz secreção puramente serosa, responsável por 25% do total da saliva em repouso; a submandibular, uma mistura serosa e mucosa, representando 60% da saliva; e a sublingual uma secreção quase puramente mucosa, cerca de 5% da saliva (Ross, 1993; Thylstrup 1988).

Espalhadas pela cavidade bucal as glândulas menores são classificadas como serosas, mucosas e mistas. As glândulas bucais e labiais têm secreção mista; as palatinas têm secreção mucosa; e as linguais têm secreção mista, serosa e mucosa, conforme localização na língua (Avery, 2001).

A saliva é formada em dois estágios: a secreção primária ocorre no ácino e sofre modificações posteriores, a medida que passa pelo ducto (Edgar, 1992; Maringini et al, 1991). A que está presente na boca é referida como “saliva total” e, além dos componentes orgânicos e inorgânicos, apresenta células epiteliais descamadas e bactérias (Edgar, 1992).

Dois componentes são secretados por mecanismos independentes, um componente fluido que inclui íons, produzido principalmente por estímulo parassimpático e um componente protéico liberado, principalmente, em resposta a um estímulo simpático (Scully, 2003).

A taxa de secreção salivar na boca é determinada pela taxa de formação de saliva primária nas células acinares. Sabe-se que fatores fisiológicos influenciam a composição e o fluxo salivar e que a composição final da saliva depende fortemente do fluxo (Fejerskov & Kidd, 2005; Thylstrup & Fejerskov, 2001; Edgar, 1992).

Composição salivar e alterações sistêmicas

A saliva tem ganhado destaque em análises clínicas, por conter um grande número de elementos, ser um fluido corporal de fácil acesso e procedimento de coleta não invasivo (Agha-Hosseini et al, 2005; Lac, 2001). Estudos têm sido publicados sobre a relação de doenças sistêmicas e composição salivar (Oliveira et al, 2000, Pedersen et al, 2005; Schramm et al, 1999; Thieme et al, 1992) mas, a maioria dos estudos com saliva são, ainda, relacionados à saúde bucal (Kinirons, 1983; Lawrence, 2002; Martins-Gomes et al, 2001).

Segundo Fejerskov & Kidd (2005), algumas doenças sistêmicas associadas à medicação causam notável declínio na secreção salivar, como, por exemplo, a Síndrome de Sjögren, *Diabetes Mellitos* (tipo I) e a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA). E segundo Pedersen et al (2006) e Siqueira et al (2004) ocorrem alterações na composição salivar nas Síndromes de Sjögren e Down, respectivamente. O uso da saliva, também, tem sido aplicado como alternativa ao sangue para o teste rápido da SIDA (Pinto et al, 2005) e para diagnóstico precoce da leptospirose humana (Silva, 1998)

Composição Inorgânica

Os mecanismos envolvidos na secreção eletrolítica são de origem complexa devido à diversidade de eventos envolvidos. A elucidação desses mecanismos iniciou-se em 1954, com a teoria da formação da saliva em dois estágios. Posteriormente, em 1958, o transporte do íon cloreto foi designado como o principal evento na secreção salivar (Maringoni et al, 1991). Os principais

componentes inorgânicos da saliva estão resumidos no Quadro1 (Fegerskov & Kidd, 2005; Edgar 1992).

Componente		Comentários	
Íon Hidrogênio	H^+		Influencia na maioria das reações químicas que ocorrem na cavidade oral
Cálcio	Ca^{++}		Importante para eventos que ocorrem no desafio cariogênico
Magnésio	Mg^{++}		Ativador de certas enzimas
Sódio	Na^+		Contribuinte para osmolaridade da saliva
Potássio	K^+		Contribuinte para osmolaridade da saliva
Cloreto	Cl^-		Contribuinte para osmolaridade da saliva
Fluoreto	F^-		Importante ação anticariogênica
Complexos iônicos do flúor	Fluoreto de cálcio	CaF_2	Lento liberador de flúor
	Fluoreto de Magnésio	MgF	Este composto atua em funções enzimáticas
	Fluoreto de sódio	NaF	Reatividade com esmalte dental
Fosfato inorgânico	Ácido fosfórico	H_3PO_4	A soma constitui o total de fosfato medido em laboratório
	Íon fosfato primário	$H_2PO_4^-$	Função na contribuição para o produto de solubilidade com relação ao fosfato de cálcio
	Íon fosfato secundário	HPO_4^{2-}	Importante nutriente para microbiota oral, essencial para várias vias metabólicas
	Íon fosfato terciário	PO_4^{3-}	
	Ácido pirofosfórico	$H_4P_2O_7$	Potente inibidor da precipitação do fosfato de cálcio e influencia na formação de cálculo
Tiocianato	SCN^-		É transformado em hipotiocianito ($OSCN^-$), uma potente substância antibacteriana
Bicarbonato	HCO_3^-		Contribuinte para osmolaridade da saliva
Sistema ácido carbônico/bicarbonato	$CO_2 + H_2O \rightleftharpoons H_2CO_3 \rightleftharpoons HCO_3^- + H^+$		Resistência contra alterações do Ph – capacidade tampão
Sistema ortofosfato inorgânico	$HPO_4^{2-} + H^+ \rightleftharpoons H_2PO_4^-$		

Quadro 1 – Principais componentes inorgânicos da saliva.

Composição orgânica

Células serosas, mucosas ou uma combinação denominada meia-lua serosa constituem ambos os grupos de glândulas salivares. As células serosas são ricas em proteína e pobres em carboidrato, produzindo uma secreção de consistência aquosa (fina). As células mucosas são pobres em proteína e ricas em carboidratos, e liberam um produto viscoso chamado mucina (Ross, 1993). A diferença entre a glicoproteína serosa e mucosa está na quantidade de carboidrato associado a proteína (Fejerskov e Kidd, 2005)

Na composição orgânica da saliva estão presentes proteínas, enzimas, imunoglobulinas, glicoproteínas, glicose e outros, (Quadro 2) (Fejerskov e Kidd, 2005, Maringoni et al, 1991; Martins-Gomes et al, 2001).

Componente		Comentários
α-amilase		Função de metabolizar o amido em maltose
Lisozima		Efeito antimicrobiano direto na parede da célula, provocando autólise, exerce funções antimicrobianas antes da erupção dentária
Lactoferrina		Função antimicrobiana
Aglutininas		Capacidade de interagir com bactérias não aderidas e formar agregados, o que facilita a remoção de microorganismos da cavidade bucal
Glicoproteínas		Quase todas as proteínas salivares são glicoproteínas, ou seja, contém quantidades variáveis de carboidratos ligados ao seu núcleo protéico
Mucinas	MG1	Alto peso molecular
	MG2	Baixo peso molecular
		Efetivas na lubrificação e manutenção da superfície da mucosa úmida
		Pode mediar a adesão de bactérias específicas à superfície dos dentes
		Ajudam proteger a mucosa de infecções
β ₂ -microglobulina		Capacidade de aglutinar efetivamente muitas cepas de estreptococos orais, incluindo os <i>S. Mutans</i>
Fibronectina		Aglutina estreptococos bucais
Cistatinas		Inibição de determinadas proteases bacterianas e proteases originadas da lise de leucócitos. Atua como antivirótica
Estaterinas		Papel especial na homeostase do cálcio bucal
		Promove adesão dos <i>Actinomyces viscosus</i> às superfícies dentárias
Proteína rica em prolina		Podem inibir a precipitação espontânea de sais de cálcio
Sistema peroxidase	Peroxidase	Atividade antimicrobiana e proteção das proteínas e células do hospedeiro contra a toxicidade do peróxido de hidrogênio
	Mieloperoxidase	
Imunoglobulinas	IgA secretora	Principal imunoglobulina encontrada na saliva. Protege o organismo de invasão viral ou bacteriana através das mucosas
		Inibição de adesão
	IgG	Aumento da fagocitose
	IgM	Aumento da fagocitose
Uréia		Causa uma rápida elevação no pH do biofilme dental e representa o produto final do catabolismo humano das proteínas
Citrato	$C_6H_5O_7^{3-}$	Aumenta após exposição da cavidade bucal ao ácido cítrico (ex: frutas cítricas). Pode agir como quelante e ligar-se fortemente ao cálcio
Lipídios		A maioria está associada a proteínas
Carboidratos		Traços de carboidratos na saliva

Quadro 2 – Principais componentes orgânicos da saliva.

Hipóteses

– Sendo, a Fibrose Cística, uma doença de reconhecido efeito em diversas glândulas de tecido epitelial do organismo humano, também poderá afetar as glândulas salivares e a composição da sua secreção.

– O conhecimento da composição salivar e suas correlações com o diagnóstico da Fibrose Cística poderá ser usado para melhor elucidação da doença, tanto como método de triagem como de diagnóstico.

Objetivos

Objetivo geral

Estudar a saliva de indivíduos com diagnóstico de Fibrose Cística, com vistas à identificação de marcadores que possam contribuir para triagem ou diagnóstico precoce e preciso da patologia.

Objetivos específicos

Para consecução do objetivo geral proposto, foi feito o estudo comparativo da saliva entre indivíduos com FC e indivíduos saudáveis, com o objetivo de determinar o seguinte:

- A composição inorgânica da saliva;
- As proteínas salivares, em gel de eletroforese SDS-PAGE;
- As proteínas salivares, por meio de eletroforese bidimensional (2-DE)
- Sequência de peptídeos e identificação de proteínas salivares por espectrometria de massa (EM);
- A existência e identificação de biomarcadores para uso no diagnóstico da patologia.

Artigo I

Elementos traço na saliva de pacientes com Fibrose Cística

(The Journal of Pediatrics ISSN 0022-3476)

Artigo enviado para publicação na revista internacional Archives of Oral Biology

Liliani A. C. Vieira^{a*}, Luiz F Zara^c, Carlos F. de S. Castro^d, Gilvânia C. S. Feijó^{b#}, Ana C. B. Bezerra^{a#}

[#]Igualdade de contribuição na elaboração do projeto

^a Departamento de Odontologia, Universidade de Brasília, Brasília-DF

^b Departamento de Ciências Naturais, Universidade de Brasília, Brasília-DF

^c Laboratório de Espectroscopia Atômica Aplicada, Universidade Católica de Brasília, Taguatinga-DF

^d Professor associado, Centro Federal Tecnológico Educacional de Rio Verde , Rio Verde-GO

E-mail: Liliani A. C. Vieira – lilianivieira@gmail.com; Gilvânia C. S. Feijó – gilvania@fiejo.com.br; Luiz F Zara – zara@pos.ucb.br; Carlos F. de S. Castro – cfederico@cefetrv.edu.br; Ana C. B. Bezerra – acrisbarreto@gmail.com

*Corresponding author. Tel.: +1 55 62 92922814 / +1 55 32042514

E-mail address: lilianivieira@gmail.com (L. A. C. Vieira)

Resumo

Objetivo: A Fibrose Cística (FC) é uma doença hereditária de alta incidência. Devido ao comprometimento patológico iniciado em tenra idade e ao alto índice de mortalidade, o diagnóstico precoce é decisivo para um bom prognóstico. Este estudo teve por objetivo comparar a composição inorgânica da saliva de indivíduos com FC e indivíduos saudáveis.

Material e Métodos: 35 indivíduos com FC e 39 indivíduos saudáveis participaram desse estudo. A distribuição de Al, As, B, Ba, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, K, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, Pb, Se, Si, Sr, Ti, V e Zn na saliva total estimulada foi avaliada por espectrometria de massa com plasma de argônio acoplado indutivamente (ICP-MS), espectrometria de emissão óptica com plasma de argônio acoplado indutivamente (ICP-OES) e espectrometria de absorção atômica (AAS).

Resultados: Na, K, V, Cr, As e Se apresentaram diferenças estatísticas entre grupos, enquanto, Al, B, Ba, Cd, Cu, Fe, Hg, Mg, Mn, Ni, Ti, Sr e Zn não apresentaram. Na e K apresentam maiores teores que V, Cr e Se, e o As apresentou menor entre os indivíduos com FC.

Conclusões: Os resultados indicam uma diferença significativa na distribuição de elementos traço na saliva de indivíduos com FC comparados à indivíduos saudáveis. A saliva total é uma fonte potencial de informação sobre a FC e no futuro é possível que se desenvolva um teste de diagnóstico através da saliva. Mais estudos são necessários para estabelecer níveis padrão de elementos traço na saliva.

Palavras-chave: Fibrose cística; saliva; íons; diagnóstico.

Abreviações: CF, Cystic Fibrosis; ICP-MS, espectrometria de massa com plasma de argônio acoplado indutivamente; ICP-OES, espectrometria de emissão óptica com plasma de argônio acoplado indutivamente; AAS espectrometria de absorção atômica.

Abstract

Objective: Cystic Fibrosis (CF) is a high incidence inherited disease. Given its pathological character in early age and high mortality rate, early diagnosis is decisive for good prognostic. This study aims to compare inorganic composition of saliva between CF patients and healthy individuals.

Material and Methods: 35 CF patients and 39 healthy individuals participated in this study. Distribution of Al, As, B, Ba, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, K, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, Pb, Se, Si, Sr, Ti, V, Zn in stimulated whole saliva was evaluated by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS), inductively coupled plasma-optical emission spectrometry (ICP-OES) and atomic absorption spectrometer (AAS).

Results: Na, K, V, Cr, As, Se present statistical differences between groups while Al, B, Ba, Cd, Cu, Fe, Hg, Mg, Mn, Ni, Ti, Sr, and Zn did not. Na and K presented larger contents while V, Cr, Se, and As appeared in smaller amounts in CF individuals.

Conclusions: Results indicate a significant difference in the distribution of trace elements in saliva of individuals with CF compared to healthy individuals. Whole saliva is a potential source of information about CF. Further studies are necessary to establish standard saliva trace element levels.

Key words: Cystic Fobrosis; saliva; ions; diagnostic.

Abbreviations: CF, Cystic Fibrosis; ICP-MS, inductively coupled plasma mass spectrometry; ICP-OES, inductively coupled plasma-optical emission spectrometry; AAS, atomic absorption spectrometer

Introdução

A Fibrose Cística (FC) é a doença monogênica autossômica recessiva e letal muito comum em caucasianos¹. É causada por mutações no gene *Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator (CFTR)*, situado no cromossomo 7q31.2, o qual codifica uma glicoproteína transmembrana, que atua no transporte eletrolítico na membrana apical de células epiteliais². Afeta as células epiteliais de vários órgãos, incluindo o trato respiratório, pâncreas exócrino, intestino, vaso deferente, sistema hepatobiliar e as glândulas sudoríparas exócrinas^{2,3,4}. As principais manifestações da doença, aparecendo em diferentes graus de expressão clínica, caracterizam a tríade: concentrações aumentadas de eletrólitos no suor; doença pulmonar obstrutiva crônica; e insuficiência pancreática com má digestão e má absorção secundárias⁵.

O diagnóstico da FC baseia-se em achados clínicos clássicos: manifestações pulmonares e/ou gastrointestinais típicas; história de casos de FC na família; e demonstração de níveis elevados de íons Sódio e Cloreto no suor². O diagnóstico precoce mostrou ser decisivo na efetividade do tratamento, contribuindo para melhoria na qualidade e aumento da expectativa de vida dos indivíduos⁶.

A saliva é um fluido corporal fácil de ser coletado devido ao acesso e procedimento não invasivo, tanto a proveniente de um único par de glândulas como a acumulada na cavidade bucal, conhecida como saliva total^{7,8,9}. É abundante, secretada numa taxa relativamente regular e contém alguns elementos que a tornam de interesse nas análises biológicas⁸. Os testes salivares têm apresentado correlações positivas com os sanguíneos e a saliva tem sido usada em análises clínicas para diagnóstico de doenças, monitoramento de drogas terapêuticas e estudos de doenças das glândulas salivares^{10,11,12}.

Este trabalho parte do pressuposto que indivíduos com FC apresentam alteração na composição salivar, uma vez que a doença afeta o transporte de íons através da membrana celular, envolvendo o fluxo de Cl e Na. Pouco se sabe sobre a composição salivar e suas correlações com a FC. Esse conhecimento pode contribuir para o melhor entendimento da doença.

Métodos

Local da realização das atividades

O trabalho foi realizado no Laboratório de Espectroscopia Atômica Aplicada do Hospital da Universidade Católica de Brasília (LEAA/HUCB). Todos os indivíduos, ou seus responsáveis, leram e assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido. Os estudos foram aprovados por Comitê de Ética em Pesquisa (Protocolo CEP/UCB N° 035/2005).

Características da população

Foi coletada saliva de 45 indivíduos com FC da Região Centro Oeste do Brasil, cadastrados no programa de atendimento multidisciplinar aos portadores de FC do HUCB. Oito amostras foram descartadas por dúvidas no diagnóstico da doença e 2 por razões estatísticas. Para os tratamentos controle foram coletadas 43 amostras de indivíduos saudáveis, da mesma região, tendo sido descartadas quatro amostras por não cumprimento aos critérios de inclusão estabelecidos: ausência de doença congênita ou sistêmica, de abscesso dental e de qualquer terapia medicamentosa. Ambos os grupos continham meninos e meninas com idade entre 5 e 15 anos, com o mesmo padrão de saúde bucal (ausência de abscessos, sangramento gengival, cavidades e aparelho ortodôntico) Os grupos ficaram assim constituídos: grupo (1), 35 indivíduos portadores de FC, sendo 12 homocigotos para a mutação $\Delta F508$, 11 heterocigotos para a mutação $\Delta F508$ e 12 portadores de outras mutações; e grupo (2) formado por 39 indivíduos saudáveis.

Procedimento de amostragem

As amostras de saliva foram coletadas por apenas um pesquisador. Os indivíduos foram orientados a realizar a higiene oral duas horas antes da coleta e a não ingerir nenhum alimento ou bebida até o procedimento. A saliva total foi coletada pela manhã, no mesmo horário, para padronização dos ritmos circadianos. Com os indivíduos sentados confortavelmente, foi pedido que eles mascassem um pedaço de borracha de garrote (05 mm x 10 mm), para estimular a produção da saliva, desprezando-se a produção dos primeiros 30 segundos. A saliva foi coletada em recipientes plásticos até o volume de 5 mL, por um tempo máximo de 20 minutos. O total de cada paciente foi dividido em cinco alíquotas de 1 mL, em tubos *ependorf* devidamente identificados, conservadas em gelo e transportadas ao laboratório, permanecendo em temperatura de -80°C até a realização dos testes.

Determinação de elementos traço na saliva

Para determinação dos elementos traço As, Ba, Cd, Pb, Co, Cu, Cr, Sr, Mn, Hg, Mo, Ni, Se, Ti e V foi utilizado um espectrômetro modelo ICP-MS (810-MS, Varian, Mulgrave, Austrália). Na determinação dos elementos traço Al, B, Ca, Fé, Mg, Si, Na e Zn, foi utilizado o modelo ICP-OES com configuração radial (Liberty II, Varian, Mulgrave, Austrália) e na determinação do elemento traço K, o modelo AAS (220FS, Varian, Mulgrave, Austrália). Um nebulizador do tipo V-Groove e uma câmara de nebulização Sturman-Master foram empregados para introdução das amostras no ICP-OES, e um nebulizador de vidro concêntrico foi utilizado para o ICP-MS. As Tabelas 1, 2 e 3 apresentam as condições

instrumentais utilizadas. Os teores de Carbono residual foram determinados pelo ICP-OES, de acordo com Gouveia et al (2001)¹³.

Reagentes e soluções

Todas as soluções foram preparadas com reagentes de grau analítico e os volumes finais ajustados com água destilada e desionizada (Máxima SC, Elga Bucks, UK). As vidrarias foram descontaminadas em banho contendo 10% v/v HNO₃ por 24 horas. Soluções de referência foram preparadas a partir de soluções estoque com 1000 mg L⁻¹ de Al, As, B, Ba, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, K, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, Pb, Se, Si, Sr, Ti, V e Zn (Alpha Resources Inc, Stevensville, MI, EUA). As soluções de referência para determinação de Carbono residual foram preparadas a partir de solução estoque 50 000 mg L⁻¹ de uréia (SYNTH P.A.), em água desionizada.

Digestão de saliva

O procedimento de digestão da saliva, para remoção da porção orgânica, foi realizado em forno de microondas analítico fechado (Ethos D, Milestone Sorisole, BG, Italy) sob radiação focalizada com 24 cavidades e frascos de digestão de teflon. As amostras foram retiradas do congelador e expostas à temperatura ambiente, sem nenhum tipo de aquecimento. Alíquotas de 1 mL de saliva foram transferidas para os frascos reacionais de teflon, sendo em seguida adicionando 5 mL de HNO₃ concentrado 65% (Merck, Alemanha) e 5 mL de água desionizada. Os frascos foram fechados, transferidos para o equipamento e foi implantado o programa de aquecimento, conforme Tabela 4. As amostras digeridas foram diluídas para um volume final de 25 mL com água desionizada e armazenada em frascos cônicos de polietileno. Posteriormente, foram diluídas em 1/20 para determinação dos elementos traço Ba, Cd, Cr, Co, Cu, Mn, Ni, Pb, Sr, Ti, V, Mo, As, Se e Hg. A quantificação dos elementos traço Al, B, Fe, Mg, Zn, Ca, Si, K e Na foi realizada pela análise direta da amostra de saliva digerida.

Tabela 1 - Parâmetros operacionais do espectrômetro de massas (ICP-MS)	
Potência (kW)	1,34
Fluxo do gás do plasma (L.min ⁻¹)	15,9
Fluxo do gás auxiliar (L.min ⁻¹)	1,53
Fluxo de nebulização (L.min ⁻¹)	0,91
Elemento / isótopo	
Arsênio (As)	75
Bário (Ba)	137
Cádmio (Cd)	111
Chumbo (Pb)	208
Cobalto (Co)	59
Cobre (Cu)	63
Cromo (Cr)	52
Estrôncio (Sr)	88
Manganês (Mn)	55
Mercúrio (Hg)	202
Molibdênio (Mo)	98
Níquel (Ni)	60
Selênio (Se)	78
Titânio (Ti)	49
Vanádio (V)	51

Tabela 2 - Parâmetros operacionais do espectrômetro de emissão óptica (ICP-OES)	
Potência (kW)	1,0
Fluxo do gás do plasma (L.min ⁻¹)	15,0
Fluxo do gás auxiliar (L.min ⁻¹)	1,5
Pressão de nebulização (kPa)	200
Voltagem do tubo foto-multiplicador (V)	800
Linhas espectrais (nm)	
Alumínio (Al)	396,152
Boro (B)	249,773
Cálcio (Ca)	422,673
Ferro (Fé)	259,940
Magnésio (Mg)	279,553
Silício (Si)	252,411
Sódio (Na)	589,592
Zinco (Zn)	206,200

Tabela 3 - Parâmetros operacionais do espectrômetro de absorção atômica (AAS)	
Linha espectral (nm)	766,5
Modo da leitura	Emissão
Modo de medida	Altura do pico
Tipo de chama	Ar / Acetileno

Tabela 4 - Programa de aquecimento para digestão de saliva em forno de microondas analítico fechado com radiação focalizada

Tempo (min)	Potência (W)	Temperatura Máxima (°C)
2	300	100
2	400	100
3	550	100
3	600	140
5	500	160
5	450	180
5	650	180
5	550	180

Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e análise de componentes principais (PCA), pelo programa SPSS® for Windows™ versão 8.0. Inicialmente, os valores obtidos para as concentrações dos elementos traço foram auto-escalados de maneira a apresentarem média nula e variância unitária para excluir quaisquer efeitos relativos à diferença de magnitude entre as variáveis.

A PCA visa à busca de variáveis capazes de explicar o padrão de correlações observado em um conjunto de variáveis. As novas variáveis, designadas componentes principais (CPs), são obtidas por combinações lineares das variáveis originais^{14,15} e apresentam-se em ordem decrescente de máxima variância, ou seja, a componente principal 1 (CP1) detém mais informações que a componente principal 2 (CP2) e assim por diante.

Resultados

Os resultados obtidos das análises das amostras de saliva dos 35 indivíduos com FC e 39 indivíduos saudáveis estão apresentados na Tabela 5. Nas amostras analisadas, os elementos traço Cd, Co, Mo, Pb e Si foram determinados abaixo dos respectivos limites de detecção, sendo excluídos da análise estatística.

A ANOVA mostrou diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) nas concentrações dos elementos Na, K, V, Cr, As e Se entre os dois grupos (Tabela 6). O grupo FC apresentou, em média, maiores teores de Na e K ($167,72 \pm 101,61$ mg.L-1 e $1249,01 \pm 446,95$ mg.L-1) quando comparado ao grupo controle ($91,75 \pm 76,05$ mg.L-1 e $983,95 \pm 564,85$ mg.L-1) significando um aumento de aproximadamente 83% de Na e 27% de K nas amostras de saliva de FC. Os elementos Cr, Se e V apresentaram menores teores no grupo FC ($14,55 \pm 18,43$ mg L-1; $10,13 \pm 27,93$ mg L-1 e $0,89 \pm 2,88$ mg L-1) quando comparado ao grupo controle ($46,75 \pm 29,70$ mg L-1; $52,84 \pm 53,20$ mg L-1 e $6,00 \pm 4,26$ mg

L-1), significando uma diminuição de aproximadamente 70% de Cr, 80% de Se e 85% de V nas amostras de saliva desse indivíduos. O nível do elemento As nas amostras de FC estão abaixo do limite de quantificação da técnica de espectroscopia de massa (ICP-MS), entretanto as amostras do grupo controle apresentam valores médios de $8,74 \pm 11,36 \text{ mgL}^{-1}$. Os teores dos elementos traço Al, B, Ba, Cd, Cu, Fe, Hg, Mg, Mn, Ni, Ti, Sr e Zn não apresentaram diferenças estatísticas significativas na comparação entre os dois grupos (Tabela 5).

Os resultados da análise PCA (Figura 1) possibilitam a identificação de um padrão de separação dos grupos com 39,3% da variância (CP1 = 24,5% e CP2=14,8%). Os elementos traço predominantes em CP1 foram Ca (-0,819), V (0,769), Cr (0,881), K (-0,859) e Se (0,655). O grupo controle apresentou altos valores de CP1, enquanto que o grupo FC apresentou baixos valores de CP1 (Tabela 7).

Tabela 5 - Média e desvio padrão (Dp) da concentração de cada elemento nos dois grupos

Metais	Grupo 1 FC (n 35)		Grupo 2 Controle (n 39)	
	Média	DP	Média	DP
Alumínio	0,05	0,14	0,17	0,50
Boro	0,10	0,26	0,03	0,10
Bário	21,15	116,31	0,42	2,35
Cálcio	42,27	53,87	37,38	66,88
Cobre	40,83	115,44	65,38	71,15
Ferro	0,01	0,08	0,18	0,57
Mercúrio	0,43	2,55	0,00	0,00
Magnésio	1,71	1,88	1,92	1,40
Manganês	0,43	2,52	0,01	0,30
Níquel	0,97	4,64	17,03	78,25
Estrôncio	5,71	13,03	2,08	9,21
Titânio	0,56	2,37	1,84	11,25
Zinco	2,03	5,25	0,33	1,90
Arsênio	0,00	0,00	8,74	11,36
Cromo	14,55	18,43	46,75	29,70
Potássio	1249,01	446,95	983,95	564,85
Sódio	167,72	101,61	91,75	76,05
Selênio	10,13	27,93	52,84	53,20
Vanádio	0,89	2,88	6,00	4,26

Tabela 6 - Elementos com diferença estatística significativa entre os grupos p (<0,05) ANOVA

Metais	Grupo 1 FC (n 35)		Grupo 2 Controle (n 39)		P
	Média	Dp	Média	Dp	
Arsênio	0,00	0,00	8,74	11,36	0,00002
Cromo	14,55	18,43	46,75	29,70	0,0000005
Potássio	1249,01	446,95	983,95	564,85	0,03
Sódio	167,72	101,61	91,75	76,05	0,0005
Selênio	10,13	27,93	52,84	53,20	0,00006
Vanádio	0,89	2,88	6,00	4,26	0,05

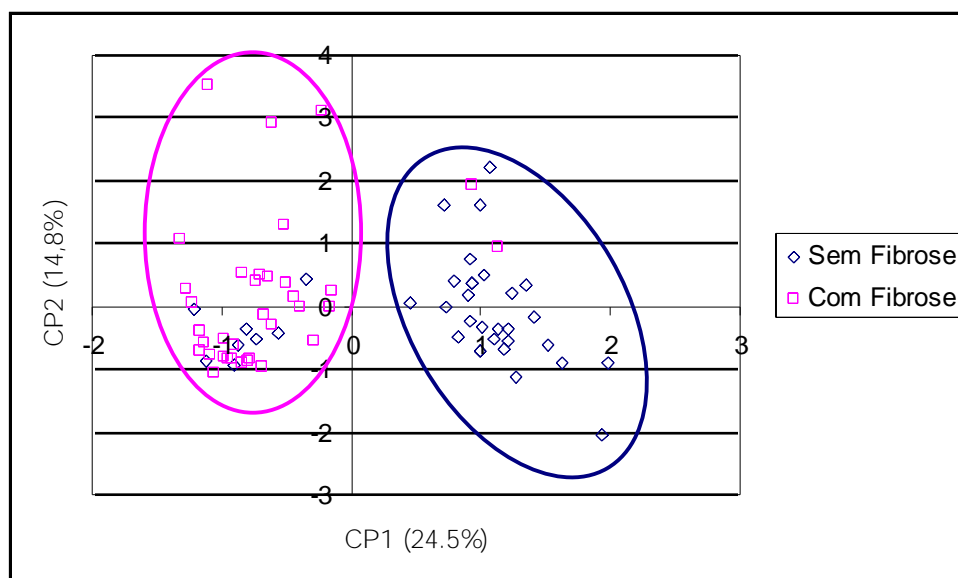


Figura 1 - Apresentação de componentes principais em dois grupos distintos.

Tabela 7 - Elementos predominantes na Análise de Componentes Principais, em CP1.

Metais	Grupo 1 FC (n 35)		Grupo 2 Controle (n 39)	
	Média	Dp	Média	Dp
Cálcio	42,27	53,87	37,38	66,88
Cromo	14,55	18,43	46,75	29,70
Potássio	1249,01	446,95	983,95	564,85
Selênio	10,13	27,93	52,84	53,20
Vanádio	0,89	2,88	6,00	4,26

Discussão

Este estudo teve por objetivo comparar os elementos traço na saliva de indivíduos com FC e indivíduos saudáveis, utilizando o método de coleta de saliva total estimulada e análises por espectroscopia.

A coleta de saliva é relatada em outros estudos^{8,16} como um procedimento fácil e não invasivo, o que se comprovou neste estudo. Os indivíduos participaram do processo de forma tranqüila e confortável, o que reforça suas vantagens sobre outros materiais biológicos, cuja coleta provoca situações de estresse nos indivíduos.

Os resultados obtidos das análises das amostras de saliva dos 35 Indivíduos com FC e 39 indivíduos saudáveis estão apresentados na Tabela 5. Nas amostras analisadas Cd, Co, Mo, Pb e Si estão em níveis abaixo dos respectivos limites de detecção, sendo excluídos da análise estatística. Os elementos Al, B, Ba, Cd, Cu, Fe, Hg, Mg, Mn, Ni, Ti, Sr e Zn não apresentaram diferenças estatísticas significativas nas concentrações entre indivíduos com FC e saudáveis (Tabela 5).

Os resultados mostraram diferença estatisticamente significativa na concentração dos elementos Na, K, V, Cr, Se e As ($p < 0,05$), Tabela 6. A comparação dos resultados obtidos com estudos prévios torna-se difícil pelos poucos trabalhos realizados e diferentes métodos empregados. Apenas dois trabalhos relacionados à saliva de portadores de FC foram encontrados na literatura. O estudo com homocigoto e heterocigotos para a mutação ?F508 realizados por Aps et al. (2002)¹⁷ e o estudo de Jiménez Reyes & Sanchez-aguirre (1996)¹⁸ mostraram teor maior do elemento Na saliva de indivíduos com FC em comparação com o grupo controle.

A análise de PCA também identificou diferenças entre os grupos, permitindo observar que o grupo FC apresenta uma relação inversa entre CP1 e os valores dos elementos Ca e K, indicando que seus respectivos teores médios serão mais elevados do que o grupo controle (Figura 1 e Tabela 7).

Os resultados prévios indicam uma possível reorganização dos níveis dos elementos traço favorecendo o balanço eletrolítico entre os cátions metálicos e os ânions na saliva dos pacientes com FC.

Com os resultados obtidos é possível inferir que algumas das alterações sistêmicas na FC estão provavelmente correlacionadas com os teores de elementos traços nesses indivíduos.

O vanádio está associado a numerosas reações enzimáticas e a regulação da bomba de Na e K, estando provavelmente ligado a certas funções endócrinas^{19,20}. Outra relevante função do V está associada à atividade antibacteriana contra a *Pseudomonas aeruginosa*²¹, principal agente colonizador das vias aéreas inferiores nos FC. As infecções normalmente ocorrem no início da infância e uma vez estabelecida a erradicação pode ser

impossível, sendo o agravo da doença pulmonar progressiva um fator de risco de morbidade e mortalidade^{1,22,23}. O valor médio do elemento traço V nas amostras de saliva dos portadores de FC foi aproximadamente 85% menor (Tabela 6) quando comparado com indivíduos saudáveis sendo possível inferir que o baixo nível deste elemento em FC pode estar associado a favorecimento de colonização da bactéria *Pseudomonas aeruginosa*.

Brown RK (1994)²⁴, relata que os doentes com FC podem ser mais suscetíveis a lesão oxidativa das células quando comparado com crianças normais devido a baixa absorção de nutrientes antioxidantes e ao aumento do estresse oxidativo causado por infecções pulmonares crônicas. A literatura associa ao elemento traço Se a função antioxidante sendo um dos componentes da glutathione peroxidase, possibilitando a proteção das células contra o estresse oxidativo. O valor médio do elemento traço Se nas amostras de saliva dos indivíduos com FC foi aproximadamente 80% menor (Tabela 6) quando comparado com indivíduos saudáveis sendo possível inferir que o baixo nível deste elemento em FC, está de acordo com a baixa absorção de elementos essenciais podendo potencializar a suscetibilidade das lesões oxidativas²⁵.

O *diabetes mellitus* associado à doença pancreática ocorre em aproximadamente 20% dos adultos com FC²⁶. Alves et al (2007)²⁷, relatam que o *diabetes mellitus* na FC tem início, em média, aos 20 anos de idade e as alterações do metabolismo glicêmico agravam o estado nutricional. A literatura associa ao elemento traço Cr um papel de destaque no metabolismo do açúcar devido ao estímulo da insulina nas células após ligação com receptores contendo Cr, sendo a capacidade de estímulo associada a concentração desse elemento²⁸. O valor médio do elemento traço Cr nas amostras de saliva dos portadores de FC foi aproximadamente 80% menor quando comparado com indivíduos saudáveis (Tabela 6) concordando com a hipótese de suscetibilidade ao *diabetes mellitus*. Além disso, a deficiência do elemento traço V também tem sido associada a várias disfunções fisiológicas incluindo a da glândula tireóide, metabolismo glicídico e lipídico^{19,29,30}, portanto os baixos teores dos elementos traços V e Cr podem associados elevar a potencialização da predisposição dos pacientes com FC ao *diabetes mellitus*.

Apesar de bem relatado o efeito tóxico, muitas vezes letal, o arsênio é considerado um elemento químico essencial para vida. No caso de intoxicação, existem algumas substâncias que atuam como antagonistas de metais pesados. Os fármacos Bismuth-Thiols e N-acetilcisteína possuem atividade quelante para diversos metais pesados, incluindo o arsênio. Por outro lado, são também utilizados como agente antibacteriano e agente mucolítico, respectivamente, no tratamento da FC^{31,32,33}. Outra associação de fármacos que tem sido testada no tratamento da FC contra a *Burkholderia cepacia* e a Tobramycin e Bismuth-Thiols³⁴. Com relação à significativa ausência de arsênio nas amostras de saliva dos indivíduos com FC (Tabela 6), pode-se sugerir que em função dos

medicamentos utilizados para combater as infecções pulmonares^{35,36}, o arsênio, provavelmente, esteja reagindo com esses medicamentos e deve estar sendo excretado pela urina.

Gibson & Cooke (1959)³⁷ desenvolveram o teste do suor que avalia os níveis de Na e Cl, este se tornou o principal teste para o diagnóstico da FC, com elevada sensibilidade e especificidade^{2,38}. O padrão de distribuição de Na nas amostras de saliva dos indivíduos com FC foi maior em comparação aos saudáveis (Tabela 6), mostrando que o resultado da análise de saliva segue o padrão do teste do suor.

A FC causa alterações na concentração de Cl e Na no suor, com os resultados deste trabalho sugere-se que a doença também causa alterações nas concentrações de elementos traço na saliva, e que as alterações nos teores de Na, K, V, Cr, Se e As na saliva de indivíduos com FC podem estar indicando alterações metabólicas no organismo desses pacientes. É relevante a possibilidade do desenvolvimento de um teste fácil, não invasivo, para a triagem ou diagnóstico da FC através dos teores elementos traço na saliva. A análise desses elementos traço juntamente com sinais clínicos possivelmente indicará a presença da FC. Entretanto, mais estudos são necessários para comparar também a saliva de indivíduos com FC e outros indivíduos com doenças consideradas diagnóstico diferencial da fibrose cística.

Referências (artigo I)

1. Davies JC. New tests for cystic fibrosis. *Paediatr Respir Rev.* 2006; 7S: S141–S143.
2. Mishra A, Greaves R, Massie J. The relevance of sweat testing for the diagnosis of cystic fibrosis in the genomic era. *Clin Biochem Rev.* 2005 Nov; 26: 135-153.
3. Davis PB. Cystic fibrosis since 1938. *Am J Respir Crit Care Med.*[periódico na Internet] 2006 Mar 1[acesso em 2007 Mar];173(5):475-82. Disponível em: <http://ajrccm.atsjournals.org/search.dtl>
4. Kerem E, Kerem B. Genotypes-phenotypes correlations in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol.* 1996; 22(6): 387-95.
5. Boeck K De; Weren M, Proesmans M, Kerem E. Pancreatitis Among Patients With Cystic Fibrosis: Correlation With Pancreatic Status and Genotype. *PEDIATRICS* April 2005; 115(4): 463-469
6. Santos GPC, Domingos MT, Wittig EO, Riedi CA, Rosário NA. Programa de triagem neonatal para Fibrose Cística no estado do Paraná: avaliação após 30 meses de sua implantação. *J Pediatr.* 2005; 81(3): 240-4.
7. Agha-Hosseini F, Dizgah IM, Amirkhani S. The composition of unstimulated whole saliva of healthy dental students. *J Contemp Dent Pract* [periódico na Internet]. 2005 May [acesso em 2006 nov 9]; 7(2): 104-111. Disponível em: <http://www.thejcdp.com/issue026/aghahosseini/index.htm>
8. Lac G. Saliva assays in clinical and research biology. *Pathol Biol.* 2001; 49: 660-7.
9. Edgard W M. Saliva: it secretion, composition and functions. *Br Dent J* 1992; 172: 305312
10. Magalhães MHCG, Ortega KL, Zanetti RV, Araújo NS. Diagnóstico da infecção pelo HIV utilizando-se amostras salivares. *Rev. Assoc. Paul. Cir. Dent.* 1997 set-out; 51(5): 464-7.
11. Nriagu J, Burtb B, ALindera, Ismailc A, Sohn W. Lead levels in blood and saliva in a low-income population of Detroit, Michigan. *Int J Hyg Environ Health.* 2006 March; 209(2): 109–121.
12. Silva MV. Salivadot: novo método para o diagnóstico precoce da leptospirose humana [Tese]. São Paulo. Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina, 1998.
13. Gouveia ST, Silva FV, Costa LM, Nogueira ARA, Nóbrega JA. Determination of residual carbon by inductively-coupled plasma optical emission spectrometry with axial and radial view configurations. *Anal Chim Acta.* 2001; 445: 269–75.
14. Ferreira EC, Rodrigues S. HBG, Ferreira MMC, Nóbrega JA, Nogueira ARA. Análise Exploratória dos Teores de Constituintes Inorgânicos em Sucos e Refrigerantes de Uva. *Eclét. Quím.* 2002; 27 (especial): 77
15. Neto JMM, Moita GC. Uma Introdução à Análise Exploratória de Dados Multivariados. *Quím. Nova.* 1998; 21(4): 467
16. Lawrence HP. Salivary Markers of Systemic Disease: Noninvasive Diagnosis of Disease and Monitoring of General Health. *J Can Dent Assoc.* 2002; 68(3):170-4
17. Aps JKM, Delange J, Martens LC. Salivary electrolyte concentrations are associated with cystic fibrosis transmembrane regulator genotypes. *Clin Chem Lab Med.* 2002; 40(4); 345-50.
18. Jiménez-Reyes M, Sánchez-Aguirre FJ. Sodium and Chlorine concentrations in mixed saliva of healthy and cystic fibrosis children. *Appl. Radiat. Isot.* 1996; 47(3): 273-277

19. Yamazaki RK. Redução da glicemia em ratos diabéticos tratados com sais de vanádio peroxidados [Dissertação] CURITIBA: Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas, 2004
20. Benite AMC, Machado SP, Barreiro EJ. Considerações sobre a química bioinorgânica medicinal. *Revista Eletrônica de Farmácia*. 2007; 4(2), 131-142
21. Aendekerck S, Ghysels B, Cornelis P, Baysse C. Characterization of a new efflux pump, MexGHI-OpmD, from *Pseudomonas aeruginosa* that confers resistance to vanadium. *Microbiology*. 2002, 148: 2371-2381
22. West SEH, Zeng L, Lee BL, Kosorok MR, Laxova A, Rock MJ, et al. Respiratory Infections with *Pseudomonas aeruginosa* in Children with Cystic Fibrosis Early Detection by Serology and Assessment of Risk Factors. *JAMA*. 2002 June, 287(22): 2958-2967
23. Cannon CL, Kowalski MP, Stopak KS, Pier GB. *Pseudomonas aeruginosa*-induced apoptosis is defective in respiratory epithelial cells expressing mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Am J Respir Cell Mol Biol* [periódico na Internet] 2003 Aug [acesso em 2006 Nov 12]; 29(2): 188-97. Disponível em: <http://ajrcmb.atsjournals.org/content/vol29/issue2/index.shtml>
24. Brown RK, Kelly FJ. Evidence for increased oxidative damage in patients with cystic fibrosis. *Pediatr Res*. 1994 Oct; 36(4): 487-93
25. Rover Jr.L, Höehr NF, Vellasco AP, Kubota LT. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. *Quim. Nova*. 2001, 24 (1): 112-119
26. Sólis MSN, Torres JFM, Martínez IM, Sellés FP. Lung transplantation and the development of diabetes mellitus in adult patients with cystic fibrosis. [periódico na Internet] 2007 [acesso em 2007 Apr]; 43(2):86-91. Disponível em: <http://www.archbronconeumol.org/cgi-bin/wdbcgi.exe/abn/abneng.mrevista.fulltext?pident=13098956>
27. Alves CAD, Aguiar RA, Alves ACS, Santana MA. Diabetes mellitus: uma importante co-morbidade da fibrose cística. *Artigo J Bras Pneumol*. 2007, 33(2): 213-221
28. Gomes MR, Rogero MM, Tirapegui J. Considerações sobre cromo, insulina e exercício físico. *Rev Bras Med Esporte*. 2005Set/Out, 11(5): 262-266
29. Mukherjee B, Patra B, Mahapatra S, Banerjee P, Tiwari A, Chatterjee M. *Toxicology Letters*, 150 (2004)
30. Rocha TB, Pescara IC, Castro CFS, Silveira NA, Zara LF. Água Enriquecida Naturalmente com Vanádio e Molibdênio: Avaliação da perspectiva terapêutica. 31^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. Águas de Lindóia, São Paulo, 2005
31. Tirouvanziam R, Conrad CK, Bottiglieri T, Herzenberg LA, et al. Alta dose oral de N-acetilcisteína, um pró-fármaco da glutatona, modula a inflamação na fibrose cística. *The National Academy of Sciences of the USA PNAS*. 2006103 (12):4628-4632
32. Velouira WG, Domenico P, Puma JLL, Davis JM, Gurzenda E, Kazzaz JA. In vitro activity and synergy of bismuth thiols and tobramycin against *Burkholderia cepacia* complex. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2003, 52, 915–919
33. Fux CA, Stoodley P, Hall-Stoodley L, Costerton. Bacterial biofilms: a diagnostic and therapeutic challenge. *Expert Ver. Anti-infect. Ther*. 2003; 1(4): 667-683

34. Wu C-L, Domenico P, Hassett DJ, Beveridge TJ, Houser AR, Kazzaz JA. Subinhibitory Bismuth-Thiols Reduce Virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* Vol. 26, pp. 731–738, 2002
35. Huang CT, Stewart PS. Reduction of polysaccharide production in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms by bismuth dimercaprol (BisBal) treatment. *J Antimicrobial Chemotherapy.* 1999; 44: 601-605
36. Repine JE, Bast B, Lankhorst I. Oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Resp. Crit. Care Med.* 156, 341–357. 1997
37. Luchese C. Efeito do cádmio sobre a enzima d-aminolevulinato desidratase de pulmão de rato in vitro: interação com agentes quelantes e antioxidantes [Dissertação] Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria. Bioquímica Toxicológica, 2007
38. Banner WJR, Koch M, Capin DM, Hopf SB, Chang S, Tong TG Experimental chelation therapy in chromium, lead and boron intoxication with N-acetylcysteine and other compounds. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1986; 83: 142-147.
39. Shaikh ZA, Zaman K, Tang W, VU T. Treatment of chronic cadmium nephrotoxicity by N-acetylcysteine. *Toxicol. Lett.* 1999;104: 137-142.
40. Gibson LE, Cooke RE. A test for concentration of electrolytes in sweat in cystic fibrosis of the pancreas utilizing pilocarpine by iontophoresis. *Pediatrics* 1959;23:545–9.
41. Cystic Fibrosis Foundation [homepage na Internet] [acesso em 2006 nov 9] <http://www.cff.org/research>

Artigo II

Análise da saliva total de crianças com Fibrose Cística: uma abordagem proteômica
(The Journal of Dental Research ISSN 0022-0345)

Artigo enviado para publicação na revista internacional Journal of Dental Research

Liliani A. C. Vieira^{a*}, Sébastien Charneau^b, Izabela M. Dourado Bastos^c, Jaime M. Santana^c, Marcelo V. Sousa^b, Ana C. B. Bezerra^{a#}, Gilvânia C. S. Feijó^{d#}

[#]Igualdade de contribuição na elaboração do projeto

^a Departamento de Odontologia, Universidade de Brasília, Brasília-DF

^b Departamento de Biologia Celular da Universidade de Brasília, Brasília-DF

^c Departamento da Interação Parasito-Hospedeiro da Universidade de Brasília, Brasília-DF

^d Departamento de Ciências Naturais da Universidade de Brasília, Brasília-DF

E-mail: Liliani A. C. Vieira – lilianivieira@gmail.com; Gilvânia C. S. Feijó – gilvania@fiejo.com.br; Sébastien Charneau – charneau@unb.br, Izabela M. Dourado Bastos – dourado@unb.br, Jaime M. Santana – jsantana@unb.com, Marcelo V. Sousa – mvsousa@unb.br; Ana C. B. Bezerra – acrisbarreto@gmail.com

*Corresponding author. Tel.: +1 55 62 92922814 / +1 55 32042514

E-mail address: lilianivieira@gmail.com (L. A. C. Vieira)

Resumo

Objetivo: O estudo e caracterização de proteínas tiveram avanço considerável em função de novas tecnologias e equipamentos de alta resolução. A saliva humana contém um grande número de proteínas que podem ser marcadores para o diagnóstico e monitoramento de doenças. O objetivo deste estudo foi avaliar o perfil protéico da saliva total de pacientes com Fibrose Cística (FC). **Metodologia:** O grupo FC foi subdividido de acordo com o tipo de mutação previamente detectado em exames de DNA. Proteínas salivares de 12 pacientes foram primeiro, comparadas com o grupo controle por SDS-PAGE e, em seguida, por gel de eletroforese bidimensional (2-DE) para identificar *spots* protéicos expressados diferentemente por MALDI-MS/MS **Resultados:** Foram verificadas diferenças no perfil protéico da saliva de pacientes com FC quando comparado com indivíduos saudáveis. Todos os pacientes com FC mostraram uma proteína de 38 kDa que corresponde a quatro *spots* protéicos na eletroforese 2-DE identificados por espectrometria de massa como quatro isoformas da região conservada da cadeia pesada (Ig-alpha) da imunoglobulina A (IgA). **Conclusão:** A composição protéica salivar de pacientes com FC apresenta diferenças quando comparada à indivíduos saudáveis. A abundante expressão de IgA na saliva de pacientes com FC sugere mais infecções microbianas nesse grupo comparado ao controle o que pode ser relacionado aos recorrentes processos infecciosos que afetam os pacientes doentes.

Palavras-chave: Fibrose Cística; saliva; proteômica; diagnóstico.

Abreviações: FC, Fibrose Cística; IEF, *isoelectric focusing*; IPG, *immobilized pH gradient*; 2-DE, *two-dimensional gel electrophoresis*; DTT, *dithiothreitol*; PMF, *peptide mass fingerprinting*; MALDI-TOF-MS, *matrix-assisted laser desorption/ionisation-time of flight-mass spectrometry*; SDS-PAGE, *polyacrilamide gel electrophoresis in presence of Sodium Dodecyl Sulfate*.

Abstract

Objective: Protein investigation and characterization achieved a considerable progress as a result of the availability of new technologies and high resolution equipments. Human saliva contains a large number of proteins that can be markers for diseases diagnostic and surveillance. The objective of this study was to evaluate protein profile of whole saliva obtained from Cystic Fibrosis (CF) patients. **Study design:** The CF group was subdivided according to the type of mutation previously detected through DNA testing. Saliva proteins of 12 CF patients were first compared to the control by SDS-PAGE and, after that, by two-dimensional (2-DE) gel electrophoresis to identify spots differentially expressed by MALDI-MS/MS. **Results:** Differences were observed in the protein profile of saliva from CF patients when compared to healthy individuals. All CF patients displayed a 38 kDa protein that correspond to four proteins spots in 2-DE identified by mass spectrometry representing four isoforms of conserved region of heavy chain (Ig-alpha) of immunoglobulin A (IgA). **Conclusion:** Salivary protein composition of CF patients present differences when compared to healthy individuals. The abundant expression of IgA in saliva of CF patients suggests greater microbe infection in the group as compared to the control which correlates with recurrent infection processes affecting diseased patients.

Key words: Cystic Fibrosis; saliva; proteomics; diagnosis.

Abbreviations: CF, Cystic Fibrosis; IEF, isoelectric focusing; IPG, immobilized pH gradient; 2-DE, two-dimensional gel electrophoresis; DTT, dithiothreitol; PMF, peptide mass fingerprinting; MALDI-TOF-MS, matrix-assisted laser desorption/ionisation-time of flight-mass spectrometry; SDS-PAGE, polyacrilamide gel electrophoresis in presence of Sodium Dodecyl Sulfate.

Introdução

A Fibrose Cística (FC) é uma doença genética letal, muito comum em Caucasianos, com incidência variável em vários países. A herança é autossômica resseciva e estima-se que aproximadamente 4% a 5% dos Caucasianos são heterozigotos para o gene *Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator* (CFTR)^{1,2}

O gene CFTR está situado no cromossomo 7q31.2. Codifica uma glicoproteína transmembrana, que atua no transporte eletrolítico na membrana apical de células epiteliais. Uma deleção de três pares de bases, resultando na ausência do aminoácido fenilalanina na posição 508 da proteína, mutação comumente designada $\Delta F508$, está presente em cerca de 70% dos indivíduos com FC^{1,3,4}. Mais de 1560 mutações diferentes foram definidas no gene CFTR¹.

A doença é causada pela mutação no gene da proteína CFTR, a qual funciona como um canal de cloreto⁵. O não funcionamento da proteína CFTR mutada afeta as células epiteliais de vários órgãos. É caracterizada por grandes variações na expressão clínica, envolvendo infecções pulmonares crônicas e recorrentes, insuficiência pancreática, elevados níveis de cloretos no suor, infertilidades em homens, obstrução intestinal, formação de pólipos nasal, sinusite crônica e desidratação de muco^{3,6}.

O diagnóstico da FC é realizado mais freqüentemente através da medida da concentração de íons no suor. Cerca de 80% dos pacientes com FC apresentam dosagem de Cl e Na, no suor, superiores às dos indivíduos saudáveis. Apesar disso, vários casos ainda não são detectados precocemente, seja por impossibilidade de realização do exame, resultados falsos negativos, ou por falta de informação de pais e clínicos^{3,1}. Considerando que a FC afeta diversas glândulas no organismo, o objetivo deste trabalho foi, através do estudo da proteômica da saliva total, procurar identificar diferenças entre a composição protéica da saliva de crianças com FC e crianças saudáveis.

Material

Local da realização das atividades

O trabalho foi realizado na Universidade de Brasília (UNB). Todos os pacientes ou seus responsáveis leram e assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido. Os estudos foram aprovados por Comitê de Ética em Pesquisa (Protocolo CEP/UCB N° 035/2005).

Características da população

Foi coletada saliva estimulada de 12 pacientes com FC da Região Centro Oeste do Brasil. Para controle foram coletadas 4 amostras de indivíduos saudáveis de mesma idade e da mesma região. Os critérios de inclusão no grupo controle foram a ausência de

doença congênita ou sistêmica, de abscesso dental e de qualquer terapia medicamentosa. Ambos os grupos continham meninos e meninas com idade entre 5 e 11 anos, com o mesmo padrão de saúde bucal (ausência de abscessos, sangramento gengival, cavidades e aparelho ortodôntico)

Os participantes da pesquisa foram divididos em 4 grupos de 4 indivíduos cada. Os três primeiros grupos todos formados por pacientes com FC, foram compostos da seguinte maneira: grupo 1 - paciente homocigoto para a mutação $\Delta 508$ (Δ/Δ); grupo 2 - paciente heterocigoto para a mutação $\Delta 508$ (Δ/N); grupo 3 - paciente com mutação desconhecida (N/N). O grupo 4 foi composto por indivíduos saudáveis (C/C).

Procedimento de amostragem

As amostras de saliva foram coletadas por apenas um pesquisador. Os indivíduos foram orientados a realizar a higiene oral duas horas antes da coleta e a não ingerir nenhum alimento ou bebida até o procedimento. A saliva total estimulada foi coletada pela manhã, sempre mantendo o mesmo horário, para padronização dos ritmos circadianos. Com os indivíduos sentados confortavelmente a salivação foi induzida por mastigação de um pedaço de borracha de garrote (05 mm x 10 mm). A produção dos primeiros 30 segundos foi desprezada. A saliva foi coletada em recipientes plásticos (acondicionados em gelo) e as alíquotas foram guardadas em tubos tipo *ependorf*, conservadas em gelo, transportadas ao laboratório, e permanecendo em temperatura de -80°C até a realização dos testes.

Quantificação das amostras

Amostras de saliva total obtidas a partir dos pacientes com FC e indivíduos saudáveis, foram quantificadas utilizando o *Plus One 2-DE Quant Kit* (GE Healthcare).

Determinação da composição protéica - separação por eletroforese

A separação de proteínas foi realizada por SDS-PAGE. Foi utilizado o sistema de eletroforese vertical em gel 13 cm preparado com 15% de acrilamida no gel separador e 4% no gel concentrador. As amostras foram preparadas em tampão contendo (Tris-HCl 50 mM pH 6,8; β -mercaptoetanol 15mM; SDS 2%; azul de bromofenol 0,02 % e glicerol 10%) e fervidas em banho-maria por cinco minutos. A eletroforese foi realizada em tampão Tris HCl 25 mM pH 8,3, glicina 250 mM e SDS 0,1%. Após a corrida o gel foi corado com prata (adaptado de Blum et al, 1987)⁷ e escaneados (PowerLook 1120, Amersham Biosciences, com 300 dpi de resolução). Após a digitalização da imagen, o gel foi preservado em solução de ácido acético 1%.

Preparação das amostras salivares

Após precipitação com 15% TCA e lavagens com acetona fria, 70 à 80 µg de proteínas presentes nas amostras de saliva total dos pacientes com Fibrose Cística e dos controles foram ressuspendidas em 300 µl de tampão 2-DE completo (7 M ureia, 2 M tiouréia, 85 mM DTT, 2,5% Triton X-100, 0,5% pharmalyte 3-10, 10% de isopropanol). Após incubação (1 h), as amostras desnaturadas foram centrifugado a 12.000 g x 5 min. (IPG strip de pH 3-10 de 17 cm, linear, Bio-Rad) sendo a desnaturação da amostra tampão com 7M uréia, 2M tioureaia, 85mM DTT, 2,5% Triton X-100, 0,5% anfólito pH 3-10, 10% de isopropanol. As amostras foram centrifugadas (12,000 × g, 5 min) antes da isoeletrofocalização (IEF)⁸.

Isoeletrofocalização no Ettan IPGphor3

As amostras foram aplicadas em tiras IPG linear com gel de faixa de pH 3-10, linear de 17 cm (Bio-Rad). A reidratação da tira IPG foi realizada em *reswelling tray*, a 20 °C, *overnight*. A IEF foi relizada a 20 °C usando o equipamento Ettan IPGphor3 (GE Healthcare) seguido um curso de 18 horas e 33625 Vh final, usando *manifold* com as seguintes condições: 500 V por 30 minutos a 125 Vh; 500 V por uma hora a 500 Vh; 1000 V por uma hora a 1,000 Vh; e 8,000 V por 4 horas a 32,000 Vh, com uma corrente máxima de 50 µA por tira, de acordo as instruções do fabricante e das condições padronizadas.

Antes do SDS-PAGE, as tiras IPG foram submetidas a redução em tampão de equilíbrio (50 mM Tris pH 8,8, 6 M uréia, glicerol 30%, 4% SDS) acrescido de 125 mM de DTT durante 40 min à temperatura ambiente e alquilação em equilíbrio tampão acrescido dessa vez com 300 mM de acrilamida por mais 20 minutos. O SDS-PAGE foi realizado em gel de poliacrilamida 12% executado em um sistema Protean II (Bio-Rad, Richmond, Califórnia, USA.) a temperatura constante de 20 °C. As proteínas foram visualizadas com coloração de prata e os géis foram armazenados em ácido acético 1% antes da digestão por tripisina dos *spots* selecionados^{9,10}.

Análise da imagem e identificação de proteínas digeridas por espectrometria de massa

Os géis corados com prata foram escaneados (PowerLook 1120, Amersham Biosciences, com 300 dpi de resolução). As imagens digitalizadas foram comparadas e alguns *spots* presentes no grupo FC não presentes no grupo controle foram selecionados para identificação de proteínas por *peptide mass fingerprint*, e por fragmentação no modo

MS/MS (MALDI-TOF/TOF Autoflex II, Bruker). Os *spots* de proteínas foram cortados do gel e digeridos pela tripsina como descrito por Zhang et al (2007)¹¹.

Os *spots* foram descorados em solução de 15 mM ferrocianeto de potássio e 50 mM tiosulfato de sódio, durante 10 min. Depois, os fragmentos de gel foram lavados em NH_4HCO_3 100 mM, 10 min, e em seguida em água e acetonitrila 2 vezes por 10 min. Na última lavagem os fragmentos de gel foram macerados com pistilo, e secados a vácuo em Speed-Vac (Savante) durante 20 min. Os géis secos foram reidratados por adição de 5-10 μL de uma solução NH_4HCO_3 100 mM, CaCl_2 5 mM contendo 12,5 ng/ μL de tripsina (Promega) e incubados no gelo durante 45 min, e logo adicionados de 10 μL do mesmo tampão de digestão sem enzima, e incubados a 37 °C durante 12 h. Dois microlitros de produto de digestão foram aplicados sobre o halo do poço da placa AnchorChip (600-384, Bruker) e deixados secar completamente. Depois, 1 μL de Matriz CHCA em solução de 90% acetonitrila e 0,1%TFA foi aplicado e deixado secar completamente e lavado com 2 μL de 0,1%TFA por 10 segundos a fim de retirar o excesso de sal. Em seguida a análise por MS foi realizada com descrito Zhang et al. (2007)¹¹. As espectros foram processados através o programas flexAnalysis 2.2 e BioTools 2.2 (Bruker).

As identificação das proteínas foram realizadas utilizando o programa MASCOT (<http://www.matrixscience.com>) comparado com o banco de dados NCBI nr com a taxonomia homem. Picos com sinal a cima de 15 foram incluídos nas buscas. Os parâmetros seguidos foram utilizados nas buscas: Precisão da massa monoisotópica <0,05 Da, sítio de digestão incompleta 1, propionamida da cisteína como modificação fixa, oxidação da metionina como modificação variável. No modo MS/MS, a precisão da massa iônica foi fixada para <0,5 Da

Resultados

O perfil de proteínas da saliva total de crianças com FC e de crianças saudáveis por eletroforese em gel de poliacrilamida a 15% é mostrado na figura 1. A separação eletroforética revelou variação nos perfis dos diferentes pacientes com FC comparado ao grupo controle. Uma diferença substancial pode ser notada com relação a intensidade e o tamanho de uma banda de aproximadamente 38 kDa (indicada pela seta). Essa banda está presente entre os pacientes com FC, independente do tipo de mutação, e ausente, ou com intensidade quase imperceptível, com coloração com prata no grupo controle.

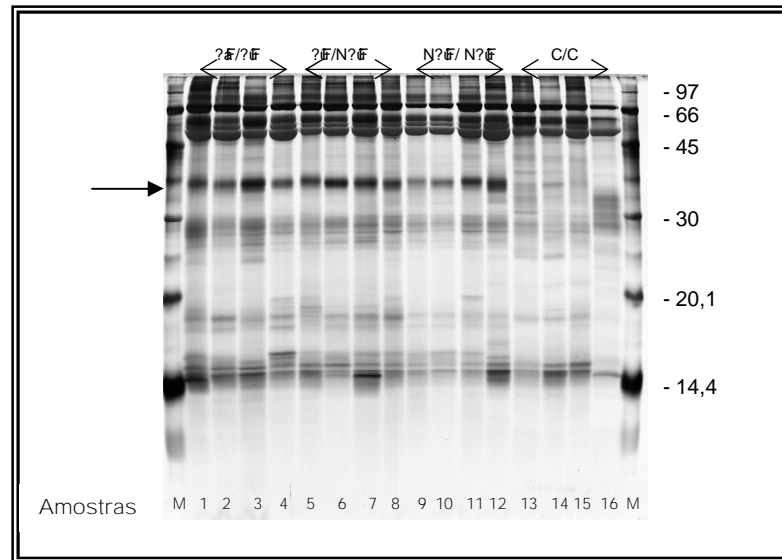


Figura 1 - Eletroforese em gel de poliacrilamida a 15%, corado com prata. Linha M, representa o marcador de massa molecular (Low Molecular Weight Calibration Kit - GE Heathcare). Linhas 1 a 4, saliva de crianças com FC homozigotos para a mutação ΔF 508. Linhas 5 a 8 saliva de pacientes com FC heterozigotos para a mutação ΔF 508. Linhas 9 a 12 saliva de pacientes com FC não apresentando a mutação ΔF 508. Linhas de 13 a 16 saliva de indivíduos saudáveis. A seta indica a presença de uma banda de 38 KDa na saliva dos pacientes com FC.

A análise da saliva total com eletroforese 2-DE foi inicialmente centrada na região entre 30 e 45 kDa, uma vez que nesta região foi notável a presença de uma banda mais intensa nas amostras de crianças com FC no gel SDS-PAGE (Figura 1). A Figura 2A, 2B e 2C mostra os géis 2-DE obtidos da saliva dos pacientes: homozigoto para mutação ΔF 508, heterozigoto para mutação ΔF 508 e indivíduo saudável, respectivamente.

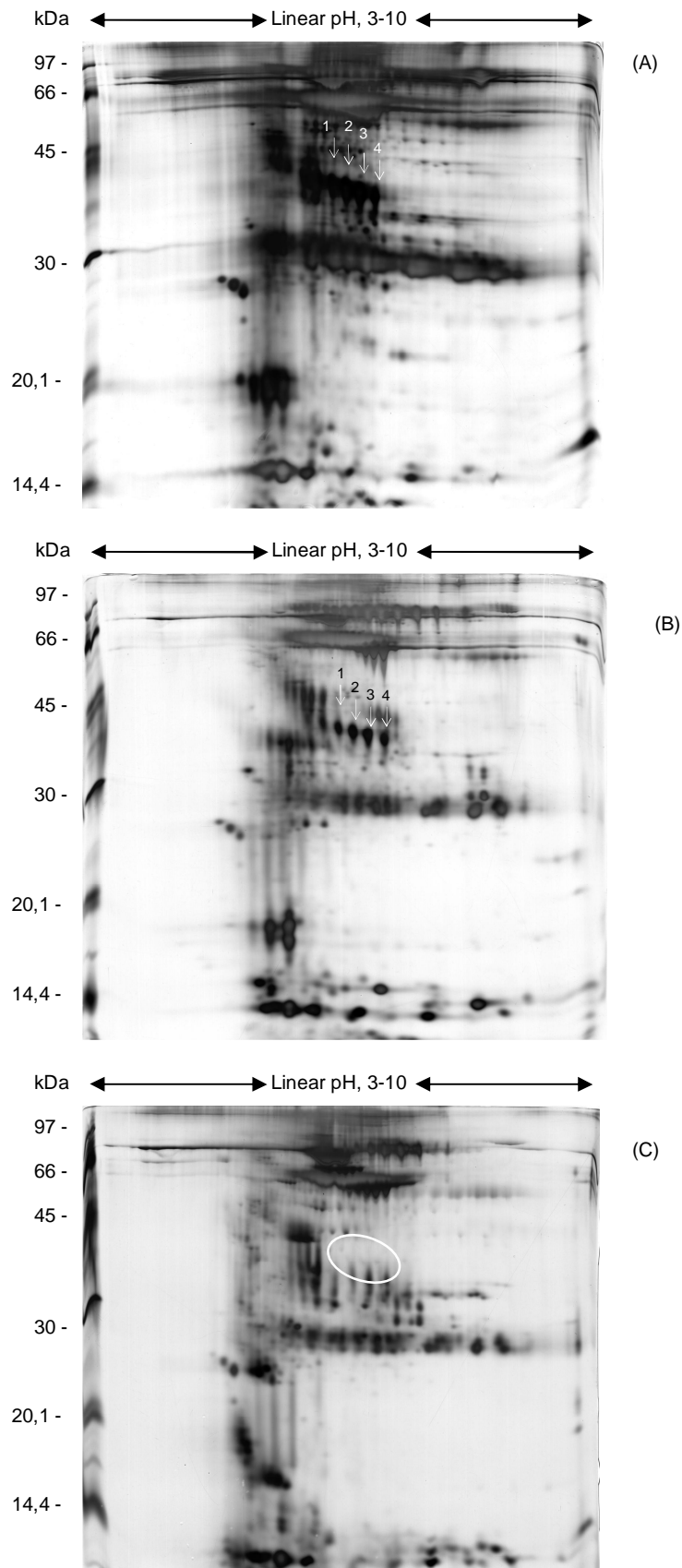


Figura 2 - IEF pH3-10, seguido de SDS-PAGE 12% corado com prata. Marcador de massa molecular Mw (kDa) (Low Molecular Weight Calibration Kit - GE Healthcare). Saliva de paciente FC homozigoto para a mutação $\Delta F 508$ (A) e heterozigoto para a mutação $\Delta F 508$ (B) com *spots* presentes na região entre 30 e 45 kDa. Diferente do perfil protéico, na mesma região, do indivíduo saudável em (C).

A partir da 2-DE, foram excisados um mínimo de 4 spots intensos (circulo nas fig. 2A e 2B) correspondentes a banda de 38 kDa observado nas salivas dos pacientes com FC tanto homozigoto como heterozigoto.

Então, peptídeos recuperados de digestões triptídicas em gel desses *spots* protéicos foram submetidos a análise por MALDI-MS e MS/MS. Mesmo que registros de massa aceitáveis fossem obtidos, não foi possível identificar proteína humana no espectro de massa. Porém, todos os espectros de massa obtidos continham dois picos conservados em m/z 1836 e 1213, respectivamente, como observado no paciente homozigoto na Figura 3. Após a fragmentação por MS, as proteínas correspondentes aos spots 1, 2, 3 e 4 no gel 2-DE (Figura 2A e 2B) foram identificados como 4 isoformas da região conservada da cadeia pesada (Ig-alpha) da imunoglobulina A (IgA) como mostrado na Tabela 1 para o *spot* 3 do paciente homozigoto (Figura 3A).

Tabela 1 - Número do spot excisado e a proteína identificada por MS/MS								
Nº spot	proteína	NCBI número de acesso	Mr (kDa) Teor	pI Teor	Massas fragmentadas	Score	Seqüência coberta (%)	
3 (Fig 2 A)	Igaã	gi 113584	38,696	6.08	1835.9742	77	4	
					1213.7170	25	2	

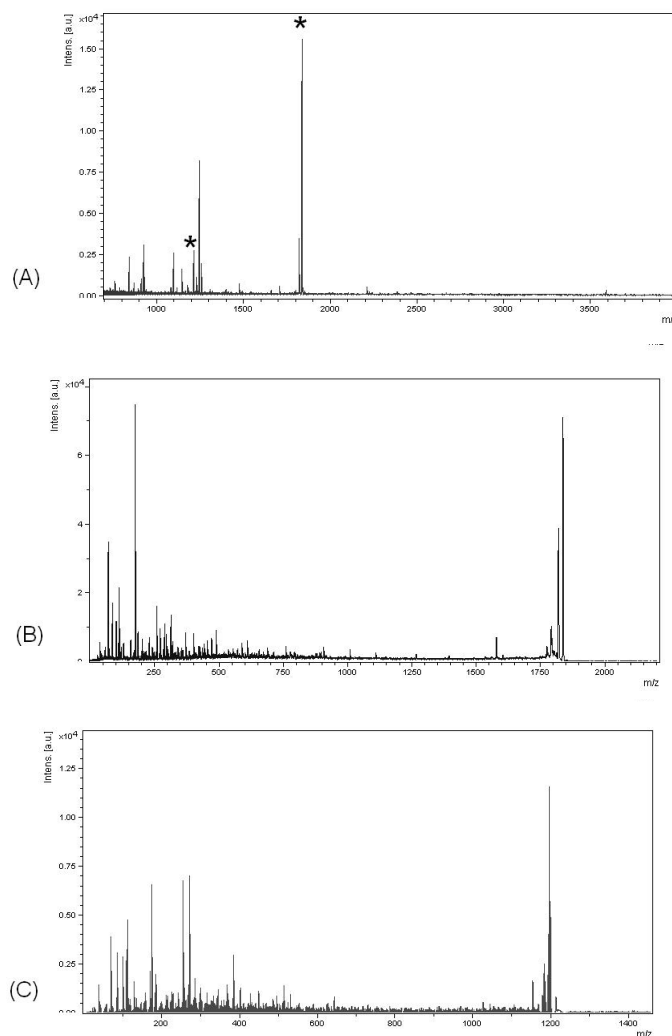


Figura 3 - *Peptide Mass Fingerprinting* (PMF) de proteínas de saliva total de paciente com FC. PMF foi gerado através do MALDI-TOF-TOF modelo Autoflex II (Bruker) (A) Espectro da fragmentação do peptídeo triptico $[M+H]^+$ $m/z = 1835.9742$ a partir do *spot* 3 do paciente homocigoto para a mutação ?F 508 que foi identificado como uma Ig alpha da cadeia pesada da região C (IgA), a seqüência identificada foi QEPSQGTTFVAVTSILR (B). Espectro da fragmentação do peptídeo triptico $[M+H]^+$ $m/z = 1213.7170$ a partir do *spot* 3 do paciente homocigoto para a mutação ?F 508 que foi identificada como uma Ig alpha da cadeia pesada da região C (IgA), a seqüência identificada foi WLQGSQELPR (C). Os íons precursors selecionados e enviados para identificação proteica por MALDI-TOF/TOF estão marcados com um asterisco no *PMF spectrum*.

Discussão

O objetivo deste estudo foi a identificação de proteínas diferentemente expressas que pudessem ser usadas para discriminar a saliva de pacientes com FC em comparação às de indivíduos saudáveis.

Para obtenção da expressão protéica na saliva, 4 etapas foram seguidas. Na primeira, realizada somente com o SDS-PAGE, as proteínas foram separadas apenas em função do seu peso molecular. Foi possível observar uma banda intensa de 38 kDa nos pacientes com FC (Figura 1), não destacada no grupo controle. Na etapa seguinte realizou-se a análise 2-DE que combinou uma isofocalização na primeira dimensão (pH 3-10) seguido por SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 12%, na segunda. Foi observada uma diferença de intensidade em alguns *spots* nos géis dos pacientes com FC correspondente a banda intensa de 38 kDa (Figura 2). Na terceira etapa, esses *spots* foram excisados e digeridos. Por fim, foram analisados por espectrometria de massa. Esses *spots* correspondem as isoformas da IgA uma vez que a região conservada da cadeia pesada é sujeita a modificações pós traducionais do tipo N- and O-glycosylation¹².

A IgA é um anticorpo presente no sangue sob a forma monomérica. É a imunoglobulina predominante em secreções como saliva, lágrima, leite, mucosas dos tratos gastrintestinal, respiratório e sistema geniturinário. Nestas secreções esta imunoglobulina tem a forma homo-dimérica, ou seja, constituída por duas moléculas de IgA. Estão unidas por uma cadeia polipeptídica, que contém uma glicoproteína denominada componente secretor, cuja função é proteger a molécula das enzimas hidrolíticas (destrutivas), fazendo desta imunoglobulina a principal defensora do organismo contra invasão viral ou bacteriana através das mucosas¹².

Os pacientes com FC freqüentemente apresentam infecções das vias aéreas inferiores, uma vez que, os fluidos secretados pelas glândulas desses pacientes são extremamente espessos, dificultando sua depuração através do batimento ciliar. Nos indivíduos com FC é bastante peculiar a colonização pela *Pseudomonas aeruginosa*³. As mucosas representam a principal via de acesso de patógenos, sendo que a proteção fornecida pela IgA é de suma importância.

Na saliva de pacientes com FC, a nitidez e intensidade dos *spots* em géis 2-DE identificados como IgA (Figura 2A e 2B) revelaram a maior concentração dessa imunoglobulina, possivelmente porque essas crianças são mais propensas às infecções que as do grupo controle.

MÁIZ et al (2008)¹³ mostraram que a maioria dos indivíduos com FC apresentaram resposta imune a *Aspergillus fumigatus* and *Candida albicans*, confirmando a elevada taxa de exposição dos doentes a estes fungos. A comparação das respostas imunes dos indivíduos com FC com os indivíduos controle confirmaram e mostraram que os

pacientes com FC têm níveis significativamente mais elevados de imunoglobulinas séricas (IgG, IgA, IgM) contra aqueles fungos, como uma resposta à colonização das vias aéreas inferiores. Os resultados encontrados neste trabalho estão de acordo com as observações de Maíz et al (2008)¹³, nas Figuras 1, 2A e 2B é nítida a maior concentração da imunoglobulina identificada como IgA nos pacientes com FC quando comparada às do grupo controle.

Para Hein et al (1988 and 1990)^{14,15} foi evidente o aumento nas concentrações IgA secretoras no soro. Os níveis mais elevados foram observados em pacientes com doença hepática obstrutiva. Os resultados encontrados por esses autores sugerem um papel relevante na avaliação da IgA na presença de envolvimento hepático em FC. A análise da saliva por 2-DE e espectrometria de massa, usada na identificação da IgA neste trabalho, possivelmente poderá ajudar na identificação precoce de manifestações clínicas na FC, como no caso da doença hepática. Isso pode colaborar para o início precoce do tratamento adequado e prevenção de maiores complicações.

A saliva contém muitos componentes de resposta imune inata e adaptativa, crucial para a defesa local do hospedeiro¹⁶. A interação entre imunidade inata e adaptativa é pré-requisito para a saúde, uma vez que a mucosa é a porta de entrada para agentes infecciosos. Os indivíduos com FC apresentam infecções recorrentes. Isto pode justificar uma alteração significativa dos componentes das respostas imunes e a nítida presença da IgA encontrada neste trabalho.

Isto também justifica a continuidade do mapeamento da saliva dos indivíduos com FC e de outras doenças sistêmicas. A análise da saliva total pode ser útil para a detecção da FC e outras doenças sistêmicas, uma vez que, apresenta componentes tão representativos como àqueles identificáveis no soro. A avaliação periódica do perfil protéico pode ser usada, ainda, para o monitoramento do estado de saúde. Uma análise proteômica global é importante para o entendimento da patogênese das doenças. Alguns pesquisadores¹⁷ têm trabalhado na tentativa de criar um mapa de referências da saliva total humana e já puderam observar mais de 200 *spots* de proteínas em um único gel 2-DE¹⁸. Com uma associação de duas técnicas para o estudo do proteoma, Hu et al (2005)¹⁹, catalogaram 309 proteínas da saliva total humana. Entre elas a *Ig alpha-1 chain C region*, com massa molecular equivalente a 37631 Da, foi encontrada em indivíduos saudáveis. Nos *spots* expressivos, excisionados dos géis das crianças com FC, analisados neste estudo, foi encontrada também a imunoglobulina *Ig alpha-1 chain C region* (Tabela 1 e Figura 3). Em contraste, não foi perceptível *spots* intensos, que pudessem ser excisionados e analisados na mesma região do gel do controle. No mapa proteômico construído por Huang et al (2004)¹⁸ 202 *spots* de proteínas da saliva total de humanos saudáveis foram exibidos com a coloração prata em eletroforese 2-DE. Contudo o autor não cita nem descreve a *Ig alpha-1*

chain C region. Das abordagens proteômicas da saliva, este último foi o único a não mencionar a IgA em indivíduos saudáveis, o que está de acordo com os resultados aqui mostrados. As justificativas para a não visualização expressiva nos géis SDS-PAGE e 2-DE da IgA nos indivíduos saudáveis (Figura 1 e 2C) podem estar relacionadas ao próprio estado de saúde, ou seja ausência de doença, critério rigorosamente aplicado para inclusão no grupo controle.

Os resultados desse trabalho mostraram uma diferença na distribuição proteica na saliva das crianças com FC quando comparados com o grupo controle. Ainda não podemos concluir se essas alterações estão acontecendo em função de alterações glandulares provocadas pela mutação no gene CFTR, ou em função das recorrentes infecções das vias aéreas sofridas pelos FC. A saliva tem sido relatada como um importante fluido usado em análises clínicas e é possível que ela contenha marcadores proteicos para o diagnóstico da FC. Para isso, entretanto, mais estudos proteômicos comparativos são necessários assim como um completo mapeamento das proteínas salivares dos indivíduos com FC.

Os resultados aqui mostrados permitem inferir que a saliva é um fluido capaz de demonstrar alterações sistêmicas, o que ficou evidente entre pacientes com FC e indivíduos saudáveis. Além disso, é relevante mencionar a facilidade da coleta deste fluido, sem injúrias ao paciente.

Referencias (artigo II)

1. Zielenski J, O'Brien A, Tsui L. Cystic fibrosis mutation database [homepage na Internet] [acesso em 2007 Apr] [atualizada em: Mar 2, 2007] Disponível em: <http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/app>
2. Maróstica PJC, Raskin R, Abreu-e-Silva F.A. Analysis of the $\Delta 508$ mutation in a Brazilian cystic fibrosis population: comparison of pulmonary status of homozygotes with other patients. *Braz J Med Biol Res.* 1998; 31(4): 529-32.
3. Mishra A, Greaves R, Massie J. The relevance of sweat testing for the diagnosis of cystic fibrosis in the genomic era. *Clin Biochem Rev.* 2005 Nov; 26: 135-153
4. Davies JC. New tests for cystic fibrosis. *Paediatr Respir Rev.* 2006; 7S: S141–S143.
5. Sermet-Gaudelus I, Roussel D, Bui S, Deneuille E, Huet F, Reix P, et al. The CF-CIRC study: a French collaborative study to assess the accuracy of cystic fibrosis diagnosis in neonatal screening. *BMC Pediatrics* [periódico na Internet]. 2006 Oct [acesso em 2006 Aug]; 6(25): [aproximadamente 7p.]. Disponível em: <http://www.biomedcentral.com/bmcpediatr/6>
6. Silva-Filho LVF da, Bussamra MHCF, Nakaie CMA, Adde FV, Rodrigues JC, Raskin S, et al. Cystic fibrosis with normal sweat chloride concentration—case report. *Rev. Hosp. Clín. Fac. Med. S. Paulo.* 2003; 58(5): 260-2.
7. Blum H, Beier H, Gross HJ. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, nº 8; p. 93-99, 1987
8. Charneau S, Junqueira M, Costa CM, Pires DL, Fernandes ES, Bussacos AC, et al. The saliva proteome of the blood-feeding insect *Triatoma infestans* is rich in platelet-aggregation inhibitors. *International Journal of Mass Spectrometry* 2007, 268, 265-276.
9. Paba J, Santana JM, Teixeira AR, Fontes W, et al. Proteomic analysis of the human pathogen *Trypanosoma cruzi*. *Proteomics* 2004, 4, 1052-1059.
10. Guercio RA, Shevchenko A, Lopez-Lozano JL, Paba J, et al. Ontogenetic variations in the venom proteome of the Amazonian snake *Bothrops atrox*. *Proteome Sci.* 2006, 4, 11
11. Zhang X, Shi L, Shu S, Wang Y, Zhao K, Xu N, et al. 2007. An improved method of simple preparation on AnchorChip™ targets for MALDI-MS and MS/MS and its application in the liver proteome Project. (*Proteomics* 2007, 7, 2340-2349).
12. Abbas Ak & Lichtman AH. *Imunologia celular e Molecular*. Elsevier. Rio de Janeiro, 2005, 5th ed, p 4-15, 330, 352
13. Máiz L, Cuevas M, Lamas A, Sousa A, Quicer S, Suárez L. *Arch Broncoceumol.* 2008; 44(3):146-151
14. Hein J, Seyfarth M, Brock J, Kirschnick HD, Schober S, Breuel K, et al. Secretory immunoglobulin A in serum of CF patients *Acta Univ Carol [Med] (Praha).* 1990;36(1-4):169-70. abstract
15. Hein J, Schober S, Seyfarth M, Brock J, Kirschnick HD. Secretory immunoglobulin A (sIgA) in the serum of cystic fibrosis patients *Wien Klin Wochenschr.* 1988 Jan 22; 100(2):57-9 abstract
16. Edgar M; O'mullane D; Dawes, C. *Saliva and oral health*. 2 ed. London: British Dental Association, 1996.
17. Hu S, Loo JA, Wong DT. Human Saliva Proteome Analysis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2007; (1098): 323–329.

18. Huang Chun-Ming. Comparative proteomic analysis of human whole Saliva. Archives of Oral Biology. 2004; 49: 951-962.
19. Hu S 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: 1714-1728.

Artigo III

Caracterização de elementos traço na saliva total estimulada de crianças saudáveis
(Journal of Applied Oral Science ISSN 1678-7757)

Artigo enviado para a Revista Journal of applied Oral Science

Liliani A. C. Vieira^{a*}, Luiz F Zara^c, Carlos F. de S. Castro^d, Gilvânia C. S. Feijó^{b#}, Ana C. B. Bezerra^{a#}

[#]Igualdade de contribuição na elaboração do projeto

^a Departamento de Odontologia, Universidade de Brasília, Brasília-DF

^b Departamento de Ciências Naturais, Universidade de Brasília, Brasília-DF

^c Laboratório de Espectroscopia Atômica Aplicada, University Catholic of Brasília, Taguatinga-DF

^d Professor associado, Centro Federal Tecnológico Educacional de Rio Verde , Rio Verde-GO

E-mail: Liliani A. C. Vieira – lilianivieira@gmail.com; Gilvânia C. S. Feijó – gilvania@fiejo.com.br; Luiz F Zara – zara@pos.ucb.br; Carlos F. de S. Castro – cfrederico@cefetrv.edu.br; Ana C. B. Bezerra – acrisbarreto@gmail.com

*Corresponding author. Tel.: +1 55 62 92922814 / +1 55 32042514

E-mail address: lilianivieira@gmail.com (L. A. C. Vieira)

Resumo

Objetivo: Este estudo teve por objetivo identificar e quantificar elementos traço presentes na saliva total de 39 crianças, com idade entre 5 e 12 anos, residentes na região Centro Oeste do Brasil.

Metodos: Os elementos traço Al, As, B, Ba, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, K, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, Pb, Se, Si, Sr, Ti, V e Zn da saliva total estimulada foram analisados por espectroscopia de massa com plasma acoplado indutivamente (ICP-MS), espectroscopia de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (ICP-OES) e espectroscopia de absorção atômica (AAS).

Resultados: Os elementos traço Ba, Cr, Cu, Mn, Ni, Sr, Ti, V, Ar, Se, Hg, foram quantificado no ICP-MS, Al, Bo, Fe, Mg, Zn, Ca, Na foram quantificados no ICP-OES e o K no AAS. O Cd, Co, Mo, Pb e Si não foram quantificado, estão seu teores abaixo do limite de detecção.

Conclusões: A saliva apresenta-se como potencial fonte de informação. Muitas alterações sistêmicas podem envolver o desequilíbrio de elementos traço considerados essenciais a saúde humana. Os dados obtidos nesse estudo podem corroborar nos estudos de doenças das glândulas salivares, alterações na cavidade bucal e alterações sistêmicas.

Palavras chave: Saliva estimulada; elementos traço; saliva total.

Abreviações: ICP-MS, inductively coupled plasma mass spectrometry; ICP-OES, inductively coupled plasma-optical emission spectrometry; AAS, atomic absorption spectrometer

Abstract

Objective: The objective of this study was to identify and quantify trace elements in whole saliva of 39 children, ages 5 to 12, living in the Brazilian West Central Region.

Methods: Al, As, B, Ba, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, K, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, Pb, Se, Si, Sr, Ti, V and Zn were analyzed by spectrometry, using inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS), inductively coupled plasma-optical emission spectrometry (ICP-OES) and atomic absorption spectrometer (AAS).

Results: Ba, Cr, Cu, Mn, Ni, Sr, Ti, V, Ar, Se, Hg, were quantified in ICP-MS; Al, Bo, Fe, Mg, Zn, Ca, Na, in ICP-OES; and K in AAS. It was not possible to quantify Cd, Co, Mo, Pb, and Si because their contents were below the detection limits.

Conclusions: Saliva appears as a potential source of information for clinical purposes. Many systemic alterations may involve imbalance of trace elements considered essential to human health. Data generated in this study may corroborate investigations about salivary gland diseases, alteration in the oral cavity, and systemic alterations.

Key words: Stimulate saliva, trace elements, whole saliva.

Abbreviations: ICP-MS, inductively coupled plasma mass spectrometry; ICP-OES, inductively coupled plasma-optical emission spectrometry; AAS, atomic absorption spectrometer

Introdução

A saliva apresenta fatores determinantes para a ocorrência da cárie dentária. Constantemente têm sido publicados estudos relacionando a atividade de cárie com parâmetros salivares como pH, capacidade tampão e fluxo salivar. A concentração de elementos como Ca e Fosfato também é bem relatada. Essas concentrações são consideradas como fatores protetores da saliva em relação à cárie dentária. A composição salivar apresenta diversas proteínas com ações antimicrobianas que podem modular a microbiota bucal. Sendo ainda, um fluido corporal fácil de ser coletado devido ao acesso e procedimento não invasivo^{1,2,3,4}.

Componentes salivares têm sido usados como fonte de informações em análises clínicas. Sabe-se que fatores fisiológicos influenciam na composição e no fluxo da saliva, sendo que muitas doenças são causas comuns de hipossalivação e/ou mudanças na composição salivar⁵. Exemplos notórios são os estudos de Pedersen et al (2005)⁶ que avaliaram a composição salivar de crianças com a Síndrome de Sjögren Primária (pSS) e concluíram que a composição salivar é um potencial indicador da disfunção salivar na pSS.

Siqueira et al (2004)⁷ compararam a concentração de íons na saliva total de crianças com e sem Síndrome de Down e encontraram diferença significativa na concentração dos elementos Na e K entre os dois grupos. Por sua vez, Aps et al (2002)⁸ estudaram eletrólitos na saliva de pacientes com FC encontrando diferenças significativas entre homocigotos para a mutação (?F508), heterocigotos para ?F508 e indivíduos saudáveis.

Este trabalho propõe-se a investigar os elementos traço e seus respectivos limites de detecção na saliva total estimulada de crianças saudáveis, além dos comumente relatados na literatura como coadjuvantes nos processos de atividade de cárie e capacidade tampão.

Material

Local da realização das atividades

O trabalho foi realizado no Laboratório de Espectroscopia Atômica Aplicada do Hospital da Universidade Católica de Brasília (LEAA/HUCB) após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa (Protocolo CEP/UCB N° 035/2005). Os procedimentos foram explicados aos responsáveis pelos indivíduos e um termo de consentimento esclarecido foi previamente obtido. As amostras de saliva foram coletadas por apenas um pesquisador.

Características da população

Foi coletada saliva total de 43 crianças saudáveis, 20 do sexo masculino e 23 do sexo feminino, entre 5 e 12 anos de idade, da Região Centro Oeste do Brasil, tendo sido

descartadas quatro amostras por não cumprimento aos requisitos estabelecidos: ausência de doença congênita ou sistêmica, de abscesso dental e de qualquer terapia medicamentosa.

Procedimento de amostragem

Os indivíduos foram orientados a realizar a higiene oral duas horas antes da coleta e a não ingerir nenhum alimento ou bebida até o procedimento. A saliva total foi coletada pela manhã, no mesmo horário, para padronização dos ritmos circadianos. Com os indivíduos sentados confortavelmente, foi pedido que eles mastigassem um pedaço de borracha para garrote (05 mm x 10 mm), para estimular a produção da saliva, desprezando-se a produção dos primeiros 30 segundos. A saliva foi coletada em recipientes plásticos até o volume de 5 mL, por um tempo máximo de 20 minutos. O total de cada paciente foi dividido em cinco aliquotas de 1 mL, em tubos *ependorf* devidamente identificados, conservadas em gelo e transportadas ao laboratório, permanecendo em temperatura de -80°C até a realização dos testes.

Determinação de elementos traço na saliva

Para determinação dos elementos traço Ba, Cd, Cr, Co, Cu, Mn, Ni, Pb, Sr, Ti, V, Mo, As, Se e Hg foi utilizado um espectrômetro modelo ICP-MS (810-MS, Varian, Mulgrave, Austrália). Na determinação dos elementos traço Al, B, Fe, Mg, Zn, Ca, Si e Na, foi utilizado o modelo ICP-OES com configuração radial (Liberty II, Varian, Mulgrave, Austrália) e na determinação do elemento traço K, o modelo AAS (220FS, Varian, Mulgrave, Austrália). Um nebulizador do tipo V-Groove e uma câmara de nebulização Sturman-Master foram empregados para introdução das amostras no ICP-OES, e um nebulizador de vidro concêntrico foi utilizado para o ICP-MS. As Tabelas 1, 2 e 3 apresentam as condições instrumentais utilizadas. Os teores de Carbono residual foram determinados pelo ICP-OES, de acordo com Gouveia et al (2001)⁹.

Reagentes e soluções

Todas as soluções foram preparadas com reagentes de grau analítico e os volumes finais ajustados com água destilada e desionizada (Máxima SC, Elga Bucks, UK). As vidrarias foram descontaminadas em banho contendo 10% v/v HNO₃ por 24 horas. Soluções de referência foram preparadas a partir de soluções estoque com 1000 mg L⁻¹ de Al, As, B, Ba, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, K, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, Pb, Se, Si, Sr, Ti, V e Zn (Alpha Resources Inc, Stevensville, MI, EUA). As soluções de referência para determinação de Carbono residual foram preparadas a partir de solução estoque 50,000 mg L⁻¹ de uréia (SYNTH P.A.), em água desionizada.

Digestão de saliva

O procedimento de digestão da saliva, para remoção da porção orgânica, foi realizado em forno de microondas analítico fechado (Ethos D, Milestone Sorisole, BG, Italy) sob radiação focalizada com 24 cavidades e frascos de digestão de teflon. As amostras foram retiradas do congelador e expostas à temperatura ambiente, sem nenhum tipo de aquecimento. Alíquotas de 1 mL de saliva foram transferidas para os frascos reacionais de teflon, sendo em seguida adicionando 5 mL de HNO₃ concentrado 65% (Merck, Alemanha) e 5 mL de água desionizada. Os frascos foram fechados, transferidos para o equipamento e foi implantado o programa de aquecimento, conforme Tabela 4. As amostras digeridas foram diluídas para um volume final de 25 mL com água deionizada e armazenadas em frascos cônicos de polietileno. Posteriormente, foram diluídas em 1/20 para determinação dos elementos traço Ba, Cd, Cr, Co, Cu, Mn, Ni, Pb, Sr, Ti, V, Mo, As, Se e Hg. A quantificação dos elementos traço Al, B, Fe, Mg, Zn, Ca, Si, K e Na foi realizada pela análise direta da amostra de saliva digerida.

Potência (kW)	1,34
Fluxo do gás do plasma (L.min ⁻¹)	15,9
Fluxo do gás auxiliar (L.min ⁻¹)	1,53
Fluxo de nebulização (L.min ⁻¹)	0,91
Elemento / isótopo	
Arsênio (As)	75
Bário (Ba)	137
Cádmio (Cd)	111
Chumbo (Pb)	208
Cobalto (Co)	59
Cobre (Cu)	63
Cromo (Cr)	52
Estrôncio (Sr)	88
Manganês (Mn)	55
Mercúrio (Hg)	202
Molibdênio (Mo)	98
Níquel (Ni)	60
Selênio (Se)	78
Titânio (Ti)	49
Vanádio (V)	51

Tabela 2 - Parâmetros operacionais do espectrômetro de emissão óptica (ICP-OES)	
Potência (kW)	1,0
Fluxo do gás do plasma (L.min ⁻¹)	15,0
Fluxo do gás auxiliar (L.min ⁻¹)	1,5
Pressão de nebulização (kPa)	200
Voltagem do tubo foto-multiplicador (V)	800
Linhas espectrais (nm)	
Alumínio (Al)	396,152
Boro (B)	249,773
Cálcio (Ca)	422,673
Ferro (Fé)	259,940
Magnésio (Mg)	279,553
Silício (Si)	252,411
Sódio (Na)	589,592
Zinco (Zn)	206,200

Tabela 3 - Parâmetros operacionais do espectrômetro de absorção atômica (AAS)	
Linha espectral (nm)	766,5
Modo da leitura	Emissão
Modo de medida	Altura do pico
Tipo de chama	ar / Acetileno

Tabela 4 - Programa de aquecimento para digestão de saliva em forno de microondas analítico fechado com radiação focalizada		
Tempo (min)	Potência (W)	Temperatura Máxima (°C)
2	300	100
2	400	100
3	550	100
3	600	140
5	500	160
5	450	180
5	650	180
5	550	180

Resultados e Discussão

Foram analisadas neste estudo amostras de saliva total de 39 crianças saudáveis, com faixa etária entre 5 e 12 anos. A seleção desses elementos baseou-se nos limites de detecção e de quantificação dos aparelhos observados em estudo piloto. O limite de quantificação é uma margem de segurança correspondente a 10 vezes o limite de detecção do aparelho.

A média quantificada da concentração de elementos traço na saliva de crianças saudáveis e seus respectivos limites de detecção estão apresentados na Tabela 5. Nas amostras analisadas os elementos Cd, Co, Mo, Pb e Si foram determinados abaixo dos respectivos limites de detecção.

Tabela 5. Concentração (média) e limite de detecção de elementos traço encontrado na saliva total estimulada de crianças saudáveis idade entre 5 e 12 anos

Elementos traço	Média mgL ⁻¹	Dp	LD mgL ⁻¹
Alumínio	0,17	0,50	0,12
Boro	0,3	0,10	0,01
Bário	0,42	2,35	0,03
Cálcio	37,38	66,88	1,14
Cobre	65,38	71,15	0,01
Ferro	0,18	0,57	0,08
Mercúrio	0,00	0,00	0,18
Magnésio	1,92	1,40	0,07
Manganês	0,01	0,30	0,01
Níquel	17,03	78,25	0,05
Estrôncio	2,08	9,21	0,02
Titânio	1,84	11,25	0,19
Zinco	0,33	1,90	0,03
Arsênio	8,74	11,36	0,05
Cromo	46,75	29,70	0,02
Potássio	983,95	564,85	0,003
Sódio	91,75	76,05	0,08
Selênio	52,84	53,20	0,19
Vanádio	6,00	4,26	0,01

Este estudo detectou 19 elementos traço na saliva total estimulada. O uso dos diferentes tipos de espectrômetros destacou-se como importante e eficaz para elucidação da composição inorgânica da saliva. Existe muita diferença na concentração de elementos traço na saliva e, enquanto alguns apresentam concentrações elevadas, outros aparecem em quantidades mínimas, podendo os mesmos não serem detectados em função do tipo de equipamento.

Com base em estudos anteriores^{10,11,12,13} e considerando que a saliva pode ter grande importância como material biológico utilizado em análise clínica é válido toda informação obtida desse fluido corporal. A literatura relata¹⁴ sintomas e patologias relacionadas com o desequilíbrio na homeostase de metais.

Os íons metálicos são necessários para muitas funções vitais no organismo humano. Principalmente, os elementos Cr, Mn, Co, Ni, e Mo que estão envolvidos em processos metabólicos na regulação da produção de energia¹⁵. A partir do conhecimento da função biológica e da detecção e quantificação desses elementos essenciais, torna-se possível detectar e monitorar doenças sistêmicas. Portanto, a saliva torna-se alvo das análises clínicas, pela grande quantidade de componentes e viabilidade de coleta.

Muitos desses elementos podem estar alterados na presença de doenças sistêmicas. Os elementos Na, K e Fósforo apresentam-se com diferença estatística significativa em crianças portadoras de Fibrose Cística e crianças saudáveis⁸. Em crianças portadoras de Síndrome de Down o elemento Na encontrado na saliva apresenta-se em maior concentração quando comparado a saliva de crianças sem a síndrome⁷.

A presença dos principais elementos plasmáticos na saliva (Na, K, Ca, Cl, HNO_3^-) já foram descritos por vários autores^{2,5}. Contudo, os resultados deste trabalho abrem perspectivas para que outros elementos possam também ser avaliados e descritos, considerando o avanço tecnológico de equipamentos usados para detecção e quantificação de elementos traço, como os aparelhos utilizados neste trabalho.

A saliva não pode ser considerada apenas de interesse odontológico ou relevante somente aos estudos de doenças bucais. Deve ser considerada a facilidade da coleta, principalmente em crianças, dispensando o uso de material perfuro cortante. Embora seja conhecido que o processo de formação de saliva é complexo e sofre influências diversas¹⁶, é possível padronizar a coleta seguindo regras básicas para obtenção desse fluido.

Na literatura recente^{17,18,19} foi observado que muitos laboratórios estão realizando estudos com a saliva. Acreditamos que os resultados obtidos neste estudo, assim como a metodologia utilizada, podem ser úteis em estudos futuros.

Além da composição inorgânica avaliada neste trabalho, a composição protéica possibilita muitas informações que podem indicar alterações locais na cavidade oral e sistêmicas. Ruhl et al (2005)²⁰ estudaram as proteínas na saliva total de bebês, mensalmente, durante os primeiros doze meses de vida e observou que a maioria das proteínas salivares é expressa logo no primeiro mês de vida, mantendo um padrão durante esse período, com exceção da mucina e albumina. O estudo foi realizado utilizando a eletroforese em gel de poliacrilamida, conhecida por SDS-PAGE, onde é possível a separação protéica em função das massas moleculares. Alguns pesquisadores^{19,20} estão elaborando um mapa proteômico da saliva humana, para tanto, utilizam recursos como a eletroforese bidimensional (2-DE) aliada a espectrometria de massa. A somatória desses estudos poderá elucidar muitas manifestações orais e sistêmicas que afetam os humanos. Sugerimos que estudos posteriores correlacionem a composição orgânica e inorgânica da saliva.

Conclusões

Os resultados deste trabalho permitiram inferir que a saliva é fonte potencial para análises clínicas e contém um grande número de elementos que podem ser quantificado, considerando o desenvolvimento de técnicas e equipamentos. Os teores desses elementos, aumentados ou diminuídos no organismo, podem ser indicativos de alterações sistêmicas.

Referências (artigo III)

1. Agha-Hosseini F, Dizgah IM, Amirkhani S. The composition of unstimulated whole saliva of healthy dental students. *J Contemp Dent Pract* [periódico na Internet]. 2005 May [acesso em 2006 nov 9]; 7(2): 104-111. Disponível em: <http://www.thejcdp.com/issue026/aghahosseini/index.htm>
2. Lac G. Saliva assays in clinical and research biology. *Pathol Biol*. 2001; 49: 660-7.
3. Nriagu J, Burtb B, ALindera, Ismailc A, Sohn W. Lead levels in blood and saliva in a low-income population of Detroit, Michigan. *Int J Hyg Environ Health*. 2006 March; 209(2): 109–121.
4. Silva MV. Salivadot: novo método para o diagnóstico precoce da leptospirose humana [Tese]. São Paulo. Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina, 1998.
5. Fejerskov O & Kidd E. Cárie Dentária – A doença e seu Tratamento Clínico. Livraria Santos Editora Ltda., São Paulo, 2005, p 07-26.
6. Pedersen AML, Bardow A, Nauntofte B. Salivary changes and dental caries as potential oral markers of autoimmune salivary gland dysfunction in primary Sjögren's syndrome. *BMC Clinical Pathology* [periódico na Internet]. 2005 [acesso em 2006 fev 10]; 5(4) [aproximadamente 17p.]. Disponível em: <http://www.biomedcentral.com/1472-6890/5/4>
7. Siqueira WL, Oliveira E de, Mustacchi Z, Nicolau J. Electrolyte concentrations in saliva of children aged 6-10 years with Down syndrome. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2004 July; 98(1): 76-9.
8. Aps JKM, Delange J, Martens LC. Salivary eletrolyte concentrations are associated with cystic fibrosis transmembrane regulator genotypes. *Clin Chem Lab Med*. 2002; 40(4); 345-50.
9. Gouveia ST, Silva FV, Costa LM, Nogueira ARA, Nóbrega JA. Determination of residual carbon by inductively-coupled plasma optical emission spectrometry with axial and radial view configurations. *Anal Chim Acta*. 2001; 445: 269–75.
10. Banderas-Tarabay JA, Zacarías-D'Oleire IG, Garduño-Estrada R, Aceves-Luna E, González-Begné M. Electrophoretic Analysis of Whole Saliva and Prevalence of Dental Caries. A Study in Mexican Dental Students. *Archives of Medical Research* 2002,3 *The Journal of Contemporary Dental Practice*. 2008 March; 9(3): 499–505
11. Almeida PDV, Grégio AMT, Machado MAM, Lima AASL, Azevedo LR. Saliva Composition and Functions: A Comprehensive Review. *The Journal of Contemporary Dental Practice*. 2008 March; 9(3)
12. Farias D G de; Bezerra A C B. Salivary antibodies, amylase and protein from children with early childhood caries. *Clin Oral Invest* 2003, 7:154–157
13. Segal A, Wong DT. Salivary diagnostics: enhancing disease detection and making medicine better. *Eur J Dent Educ*. 2008; 12 (Suppl. 1): 22–29
14. Benite MC, Machado SPB, Eliezer J. Uma visão da química bioinorgânica medicinal. *Química Nova*. 2007, 30(8): 2062-2067
15. Massabni AC. Os metais e a saúde humana. [homepage na Internet] [acesso em 2008]; Disponível em: http://www.crq4.org.br/qv_metaisesaude
16. Maringoni RL, Trindade Jr AS, Atta AG. A secreção eletrolítica da saliva. *Rev Paul Med*. 1991 nov-dez; 109(6): 278-83.

17. Lamanda A, Cheaib Z, Turgut M D, Lussi A. Protein Buffering in Model Systems and in Whole Human Saliva. PLoS ONE 2(2): [periódico na Internet] [acesso em 2008 mai 20]; Disponível em: www.plosone.org
18. Huhl S, Rayment SA, Schmalz G, Hiller KA, Troxler RF. Proteins in whole saliva during the first year of infancy. J Dent Res. 2005; 84(1): 135-153.
19. Hirtz C, Chevalier F, Centeno D, Egea JC, Rossignol M, Sommerer N, Périère D de. Complexity of the human whole saliva proteome. J. Physiol. Biochem. 2005, 61(3): 469-480,
20. Hu S, Loo JA, Wong DT. Human Saliva Proteome Analysis. Ann. N.Y. Acad. Sci. 2007; (1098): 323–329
21. Huang CT, Stewart PS. Reduction of polysaccharide production in Pseudomonas aeruginosas biofilms by bismuth dimercaprol (BisBal) treatment. J Antimicrobial Chemotherapy. 1999; 44: 601-605

Considerações Finais e Perspectivas

§ O conjunto de análises da saliva por espectroscopia possibilitou a identificação de 6 elementos traço com diferença significativa entre indivíduos com Fibrose Cística e indivíduos saudáveis

§ Os elementos essenciais desenvolvem diferentes funções no organismo humano e a relação dos teores desses elementos (aumentado ou diminuído) com manifestações clínicas apresentadas pelos indivíduos com Fibrose Cística é condizente com a literatura.

§ A análise da saliva por SDS-PAGE direcionou o estudo protéico com eletroforese 2-DE, que por sua vez, possibilitou a seleção de spots presentes apenas em crianças com FC.

§ A análise por espectrometria de massa dos spots excisados dos géis de crianças com FC resultou na identificação da IgA, dados confirmados com o banco de dados do genoma humano na biblioteca da NCBI

§ Esta imunoglobulina tem função bem descrita na literatura e sua ocorrência nos indivíduos com Fibrose Cística possivelmente é em função da pré-disposição dos FC à recorrentes infecções das vias aéreas.

§ Com as avançadas tecnologias de espectroscopia e proteômica, é possível que no futuro possa ser estabelecido um modelo de diagnóstico para a Fibrose Cística, utilizando a saliva como material biológico, e a descoberta de biomarcadores da doença nesse fluido. Mais estudos serão necessários para mapear a grande variedade de *spots* e encontrar proteínas ou frações peptídicas que se tornem alvos para o diagnóstico da FC. Esta é a primeira descrição, com a proteômica, entre a saliva de portadores de fibrose cística e indivíduos saudáveis.

§ Estudos devem procurar maneiras de recompor a homeostase, equilibrando a deficiência dos elementos essenciais o que pode influenciar nas manifestações clínicas da Fibrose Cística.

§ As perspectivas, a partir deste estudo, é que a saliva possa tornar-se um meio de monitoramento da Fibrose Cística. E que seja desenvolvido um modelo de diagnóstico da doença através da saliva. O que traria o benefício do diagnóstico precoce e melhora na qualidade de vida desses pacientes.

Referencias

1. Agha-Hosseini, F. et al. The composition of unstimulated whole saliva of healthy dental students. *J Contemp Dent Pract* [periódico na Internet]. 2005 May [acesso em 2006 nov 9]; 7(2): 104-111. Disponível em: <http://www.thejcdp.com/issue026/aghahosseini/index.htm>
2. Associação Brasileira de Assistência à Mucoviscidose. [acesso em 2008 mai] Disponível em: <http://www.abram.org.br/>
3. Avery, J. K. Fundamentos de Histologia e Embriologia Bucal: uma abordagem clínica. 2ed, Ed Guanabara koogan S.A., Rio de Janeiro, 2001, p. 169-175
4. Bonucci, U. C. S. G. & Neto, U. F. Alterações digestivas da fibrose cística. *The Elect J Ped Gast Nut Liv Dis* [periódico na Internet]. 2003 Sept [acesso em 2006 Nov 12]; 7(3) [aproximadamente 16 p.]. Disponível em: <http://www.e-gastroped.com.br/sept03/fibrosecistica.htm>
5. Cabello, G. M. K. Rastreamento da fibrose cística usando-se a análise combinada do teste de IRT neonatal e o estudo molecular da mutação $\Delta F508$. *J Bras Patol Med Lab*. 2003; 39(1): 15-20.
6. Cabelo, G. M. K. Doenças Genéticas: Diagnóstico da Fibrose Cística. [homepage na Internet] [acesso em 2008 Mai]. Disponível em: [/www.ghente.org/ciencia/genetica/fibrose_cistica.htm](http://www.ghente.org/ciencia/genetica/fibrose_cistica.htm)Nota
7. Campos, T. et al. NUTRinFOCO [homepage na Internet]. São Paulo.2001 [acesso em 2006 Jun 5]. Secreção salivar. Disponível em: http://www.nutrimais.com/nutri/trabalho/trab_saliva.asp
8. Cannon, C. L. et al. Pseudomonas aeruginosa-induced apoptosis is defective in respiratory epithelial cells expressing mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Am J Respir Cell Mol Biol* [periódico na Internet] 2003 Aug [acesso em 2006 Nov 12]; 29(2): 188-97. Disponível em: <http://ajrcmb.atsjournals.org/content/vol29/issue2/index.shtml>
9. Coakley, J. et al. Australian guidelines for the performance of the sweat test for the diagnosis of cystic fibrosis. *Clin Biochem Rev* [periódico na Internet]. 2006 May [acesso em 2006 dez 06]; 27 Suppl (i): [aproximadamente 83 p.]. Disponível em <http://www.aacb.asn.au/pubs/index.htm>.
10. Cystic Fibrosis Foundation [homepage na Internet] [acesso em 2006 nov 9] <http://www.FCf.org/research>
11. Davies, J. C. New tests for cystic fibrosis. *Paediatr Respir Rev*. 2006; 7S: S141–S143.
12. Davis, P. B. & di Sant'Agnese, P. A. Diagnosis and treatment of cystic fibrosis: an update. *Chest* 1984; 85(6): 802-9.
13. Edgar, W. M. Saliva: its secretion, composition and functions. *Br Dent J*. 1992 April; 172: 305-312.
14. Fejeskov O & Kidd E. Cárie Dentária – A doença e seu Tratamento Clínico. Livraria Santos Editora Ltda., São Paulo, 2005, p 07-26.
15. Heller, K. Genetic counseling: DNA testing for the patient. *Proc (Bayl Univ Med Cent)*. 2005 April; 18(2): 134–7.
16. Kerem, E. & Kerem, B. Genotypes-phenotypes correlations in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol*. 1996; 22(6): 387-95.
17. Kinirons, M. J. Increased salivary buffering in association with a low caries experience in children suffering from cystic fibrosis. *J Dent Res*. 1983 July; 62(7): 815-7.

18. Lac, G. Saliva assays in clinical and research biology. *Pathol Biol.* 2001; 49: 660-7.
19. Lawrence, H. P. Salivary markers of systemic disease: Noninvasive diagnosis of disease and monitoring of general health. *J Can Dent Assoc.* 2002; 68(3): 170-4
20. Maringoni, R. L. et al. A secreção eletrolítica da saliva. *Rev Paul Med.* 1991 nov-dez; 109(6): 278-83.
21. Martins-Gomes, A. M. et al. A study some parameters in stimulated saliva from adolescents with dental fluorosis. *J Oral Sci.* 2001; 43(4): 225-31.
22. Mateu, E. et al. Can a place of origin of the main cystic fibrosis mutations be identified? *Am. J. Hum. Genet.* 2002; 70: 257-64.
23. Merelle, M. E. et al. Influence of neonatal screening and centralized treatment on long-term clinical outcome and survival of FC patients. *Eur Respir J.* 2001 Aug; 18(2): 306-15.
24. Mesquita, E. R. R. B. P. L. O Gene da fibrose cística em diferentes grupos populacionais [Tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências, 2001.
25. Mishra A, Greaves R, Massie J. The relevance of sweat testing for the diagnosis of cystic fibrosis in the genomic era. *Clin Biochem Rev.* 2005 Nov; 26: 135-153.
26. Oliveira, S. A. de; et al. Diagnosis of rubella infection by detecting specific immunoglobulin M antibodies in saliva samples: a clinic-based study in Niterói, RJ, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2000 jul-ago; 33(4): 335-9.
27. Pedersen, A.M.L. et al. Salivary changes and dental caries as potential oral markers of autoimmune salivary gland dysfunction in primary Sjögren's syndrome. *BMC Clinical Patology* [periódico na Internet]. 2005 [acesso em 2006 fev 10]; 5(4) [aproximadamente 17p.]. Disponível em: <http://www.biomedcentral.com/1472-6890/5/4>
28. Pinto, A. P. et al. Sexually-transmitted viral diseases in women: clinical and epidemiological aspects and advances in laboratory diagnosis. *Braz J Infect Dis.* [periódico na Internet]. 2005 Jun [citado 2007 Abr 05]; 9(3): 241-250. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-86702005000300007&lng=pt&nrm=iso. doi: 10.1590/S1413-86702005000300007
29. Raskin, S. et al. DNA analysis of cystic fibrosis in Brazil by direct PCR amplification from Guthrie cards. *Am J Med Gen.*1993; 46: 665-9.
30. Ribeiro, J. et al F. Controvérsias na fibrose cística – do pediatra ao especialista. *J Pediatr.* 2002, 78 Suppl.2: S171-S186.
31. Roche®. Intervenção precoce e prevenção do avanço da doença pulmonar na Fibrose Cística, São Paulo, 2003.
32. Ross, M. H. *Histologia: texto e atlas*, 2 ed, Panamericana, São Paulo, 1993, p. 401-406
33. Santos, G. P. C. et al. Programa de triagem neonatal para fibrose cística no estado do Paraná: avaliação após 30 meses de sua implantação. *J Pediatr.* 2005; 81(3): 240-4.
34. Schramm, W. et al. A simple saliva-based test for detecting antibodies to human immunodeficiency virus. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1999 July; 6(4): 577-80.
35. Schosield, D. & Cotran, R. S. Doenças perinatais da infância. In: Cotran RS, Kumar V, Robbins SI. *Bobbins Pathologic Basis of Disease*. 5ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A.; 1996. 381-413.

36. Scully, C. Salivary glands and saliva. *Oral Disease*. 2003; 9: 165-176.
37. Sermet-Gaudelus, I. et al. The FC-CIRC study: a French collaborative study to assess the accuracy of cystic fibrosis diagnosis in neonatal screening. *BMC Pediatrics* [periódico na Internet]. 2006 Oct [acesso em 2006 Aug]; 6(25): [aproximadamente 7p.]. Disponível em: <http://www.biomedcentral.com/bmcpediatr/6>
38. Siqueira, W. L. et al. Buffer capacity, pH, and flow rate in saliva of children aged 2–60 months with Down syndrome. *Clin Oral Invest*. 2004 Sept; 9: 26–9.
39. Silva, M. V. Salivadot: novo método para o diagnóstico precoce da leptospirose humana [Tese]. São Paulo. Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina, 1998
40. Sólis, M. S. et al. Lung transplantation and the development of diabetes mellitus in adult patients with cystic fibrosis. [periódico na Internet] 2007 [acesso em 2007 Apr]; 43(2):86-91. Disponível em: <http://www.archbronconeumol.org/cgi-bin/wdbcgi.exe/abn/abneng.mrevista.fulltext?pid=13098956>
41. Southern, K. W. & Littlewood, J. M. Newborn screening programmes for cystic fibrosis. *Paediatr Respir Rev*. 2003; 4: 299–305.
42. Southern, K. W. Newborn screening for cystic fibrosis: the practical Implications. *J R Soc Med*. 2004; 97 Suppl. 44: 57–9.
43. Thieme, T. et al. Clinicians evaluation of oral fluid samples for diagnosis of viral hepatitis. *J Clin Microbiol* [periódico na Internet]. 1992 May [acesso em 2005 Oct]; 30(5): 1076-9.
44. Thylstrup, A. & Fejerskov, O. *Cariologia clínica*. 2. ed. São Paulo, Ed. Santos, 2001. 421p.
45. Thylstrup, A. *Tratado de cariologia: Cultura médica*, 1988.