



**UNESP - Universidade Estadual Paulista**  
**“Júlio de Mesquita Filho”**  
**Faculdade de Odontologia de Araraquara**



**Natália Bertolo Domingues**

**Perfil proteômico salivar e degradação de histatinas em indivíduos com  
síndrome de Down e doença periodontal**

**Araraquara**

**2019**



**UNESP - Universidade Estadual Paulista**  
**“Júlio de Mesquita Filho”**  
**Faculdade de Odontologia de Araraquara**



**Natália Bertolo Domingues**

**Perfil proteômico salivar e degradação de histatinas em indivíduos com  
síndrome de Down e doença periodontal**

Tese apresentada à Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara para obtenção do título de Doutor em Ciências Odontológicas, na Área de Odontopediatria.

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elisa Maria  
Aparecida Giro**  
**Coorientador: Prof. Dr. Walter Luiz Siqueira**

**Araraquara**

**2019**

Domingues, Natália Bertolo

Perfil proteômico salivar e degradação de histatinas em indivíduos com síndrome de Down e doença periodontal /Natália Bertolo Domingues. --

Araraquara: [s.n.], 2019

126 f. ; 30 cm.

Tese (Doutorado em Ciências odontológicas) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia

Orientadora: Profa. Dra. Elisa Maria Aparecida Giro

Coorientador: Prof. Dr. Walter Siqueira

1.Síndrome de Down 2. Saliva 3. Proteólise 4. Doenças periodontais I. Título

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Marley C. Chiusoli Montagnoli, CRB-8/5646

Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara

Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação

**Natália Bertolo Domingues**

**Perfil proteômico salivar e degradação de histatinas em indivíduos com síndrome de Down e doença periodontal**

**Comissão Julgadora**

**Tese para obtenção do grau de Doutora em Odontopediatria**

Presidente e Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elisa Maria Aparecida Giro

2º Examinador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Luísa Botta Martins de Oliveira

3º Examinador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Debora Heller

4º Examinador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Raquel Mantuanelli Scarel-Caminaga

5º Examinador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ângela Cristina Cilense Zuanon

Araraquara, 14 de fevereiro de 2019.

## **DADOS CURRICULARES**

**Natália Bertolo Domingues**

**NASCIMENTO** 01/12/1989, São Carlos/SP

**FILIAÇÃO** José Fernando Domingues  
Heleny Rossane Bertolo Domingues

### **Formação Acadêmica:**

**2008 - 2012** Graduação em Odontologia pela Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr – UNESP.

**2013 - 2015** Curso de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas, Área de Concentração Odontopediatria, nível Mestrado, na Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr – UNESP.

**2015 - 2019** Curso de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas, Área de Concentração Odontopediatria, nível Doutorado, na Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr – UNESP.

**2017 - 2018**

Estágio de Doutorado Sanduíche no Exterior (FAPESP – BEPE) no Departamento de Bioquímica da Schulich School of Medicine & Dentistry, University of WESTERN Ontario – Canada.

## **Dedico este trabalho...**

Dedico este trabalho aos meus amados pais, José Fernando e Heleny, que são pessoas essenciais em minha vida e que não mediram esforços para me proporcionar as melhores condições, e hoje, ser possível concluir mais esta etapa. Esta conquista também é de vocês!!!

## **AGRADECIMENTOS ESPECIAIS**

À Deus, por ter guiado os meus passos para hoje chegar até aqui. Obrigada pela oportunidade de compartilhar esta trajetória com pessoas tão amadas e especiais.

Aos meus pais, José Fernando e Heleny, sem a confiança e apoio de vocês a conclusão de mais esta etapa não seria possível. Sou muito grata a tudo que fizeram por mim e reconheço as inúmeras renúncias e sacrifícios que foram necessários para que hoje esse sonho pudesse ser realidade. Obrigada por estarem sempre ao meu lado, pelo amor e carinho dispensados. Amo vocês!

À Larissa Bertolo Domingues, que além de irmã é uma grande amiga. Você é um exemplo de determinação que levo como referência. Obrigada pelo apoio e compreensão em momentos difíceis e por dividir tanto comigo. Amo você!

À minha orientadora, Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup> Elisa Maria Aparecida Giro, primeiramente agradeço pelo laço de amizade que se formou durante todos estes anos de convivência. É muito bom poder trabalhar com uma pessoa querida em quem confiamos. Agradeço também por ter abraçado este trabalho junto comigo e acreditado em minha capacidade para desenvolvê-lo. Obrigada por ser uma orientadora presente, dedicada e atenciosa, sempre pronta para ajudar. Foram muitos os desafios durante este curso de doutorado, sou imensamente grata por você tê-los superado ao meu lado. Você é um exemplo de profissional ética, dedicada, e sobretudo, humana. Levarei comigo todos os aprendizados e a eterna admiração pela pessoa e profissional que é. Sentirei saudades!

Ao Prof. Dr. Walter Siqueira, agradeço pela coorientação deste trabalho e por me receber no Siqueira Lab e assim, fazer possível o conhecimento de técnicas avançadas em pesquisa em uma universidade tão renomada como a University of Western Ontario Canada.

Aos meus amigos Aion, Bia e Pati, palavras são insuficientes para expressar tudo o que representam e a amizade que existe entre nós. Obrigada por nunca deixarem de me ouvir e me ajudar em todos os aspectos. Obrigada por, mesmo com a distância, sempre estarem tão presentes em minha vida. Eu amo vocês!

À Gabriela Mancia, uma pessoa que se tornou uma grande amiga, essencial nos meus dias morando no Canadá. Obrigada por ser tão amável e generosa. Sinto muita gratidão por toda a ajuda que você me deu na rotina de laboratório e na execução de parte do meu trabalho. Eterna chefinha que me fazia dobrar a meta, nunca vou esquecer tudo que fez por mim.

Às Associações de Pais e Amigos dos Excepcionais (APAEs), obrigada por nos receberem e acreditarem em nosso trabalho. A colaboração destas associações conosco foi essencial para a realização deste estudo.

Aos participantes da pesquisa e seus responsáveis, não existem palavras suficientes para agradecer a confiança que depositaram em mim. Sou grata pelo tempo e paciência que dispuseram para que hoje a conclusão deste trabalho fosse possível.

## **AGRADECIMENTOS**

À Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr – UNESP, representada pela digníssima diretora Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Elaine Maria Sgaviolli Massucato e pelo vice-diretor Prof. Dr. Edson Alves de Campos.

Aos professores da banca examinadora, Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Elisa Maria Aparecida Giro, Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Ana Luísa Botta Martins de Oliveira, Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Debora Heller, Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Raquel M. Scarel Caminaga e Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Ângela Cristina Cilense Zuanon por aceitarem prontamente o meu convite.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP coordenado pela Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Fernanda Lourenção Brighenti.

Aos docentes da disciplina de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr – UNESP, Ângela Cristina Cilense Zuanon, Cyneu Aguiar Pansani, Elisa Maria Aparecida Giro, Fábio César Braga de Abreu e Lima, Fernanda Lourenção Brighenti, Josimeri Hebling, Lourdes Aparecida Martins dos Santos-Pinto e Rita de Cássia Loiola Cordeiro.

À Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Raquel M. Scarel Caminaga, agradeço imensamente o tempo que dispensou em me ensinar e ajudar. Obrigada por sempre me receber de portas abertas no Laboratório de Genética Molecular, do Departamento de Morfologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr – UNESP, e assim fazer possível a realização das análises qPCR. Levo você como uma referência de professora e pesquisadora. Muito obrigada pela parceria e amizade em todos estes anos.

À Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Marcia Mayer, do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo – USP, obrigada por ceder prontamente os plasmídeos bacterianos para execução de parte da metodologia deste trabalho.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Livia Nordi Dovigo, do Departamento de Odontologia Social da Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr – UNESP, obrigada pelas orientações durante a análise estatística dos dados.

À Gabriela Pereira, bolsista de treinamento técnico da FAPESP junto ao Laboratório de Pesquisa Bioquímica e Microbiológica, do departamento de Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr – UNESP, obrigada por me ajudar na coleta dos dados e das amostras de saliva deste trabalho.

Ao Laboratório de Pesquisa Bioquímica e Microbiológica, do departamento de Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr – UNESP, coordenado pela Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fernanda Lourenção Brighenti.

Ao José Antonio Sampaio Zuanon e à Juliana Pirola Garcia, técnicos do Laboratório de Patologia, do Departamento de Fisiologia e Patologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr – UNESP, por dispenderem tempo e paciência para me ajudar na liofilização das amostras de saliva desta pesquisa.

Ao Thiago, obrigada por ser uma pessoa tão presente em minha vida. Agradeço por ter me apoiado em dias difíceis, por ter me ajudado tantas vezes e pelo incentivo que sempre me transmite.

Aos amigos tão especiais que cruzaram meu caminho, Gabriela, Mel, Rafa, Artur, Ju, Cláudia, Camilinha, Lina, Pamela e Manu, muito obrigada pela parceria, amizade e por terem tornado os meus dias no Canadá mais felizes. Vocês foram meu apoio e a minha família canadense. Obrigada pelas risadas, pelos choros, pelos desabafos, pelos dias gelados, pelos perrengues no ônibus, pelas idas na boutique, pelos encontros no *basement* com DJ tesoura, JOE KOOLS, enfim, por toda a convivência!! Vocês moram no meu coração!!!!

Aos meus colegas do Siqueira Lab, Gabriela, Claudia, Lina, Karla, David, Pamela, Naima, Yi e Cindy, obrigada pelo convívio diário, pelos cafés com Boston Cream e também por dividirem comigo as jornadas de laboratório, os *lab meetings* e, até

mesmo, os dias em que a pesquisa não saia muito bem como esperado. Sempre dispostos a ajudar e ouvir. Obrigada pelo carinho!!

À Sâmia, agradeço por todo suporte que me deu previamente a minha ida ao Canadá. Obrigada por me ajudar nas análises do doutorado e, acima de tudo, pela amizade que se formou.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação: Alexandre e Cristiano por toda atenção e disponibilidade em ajudar sempre que necessário.

Aos funcionários do Departamento de Clínica Infantil, Dulce, Soninha, Flávia, Diego, Totó, Pedrinho, Cristina e Márcia, pessoas muito queridas por mim.

Às funcionárias da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr – UNESP, Ceres, Marley, Denise, Maria Inês, Ana Cristina, Laudicélia e Maria Aparecida.

Ao funcionário do Escritório de Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr – UNESP, Renan Palomino, obrigada pela disposição e tempo em ajudar sempre que necessário.

Aos meus colegas de pós-graduação, Vinicius Krieger, Ana Carolina Mendes, Yasmin Albuquerque, Diego Giroto, Rafael Amorim, Camila Lorenzetti, Kamila Figueiredo, Leticia Campi, agradeço pela convivência, carinho e amizade.

À FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (processos nº 2015/25294-2 e 2017/00931-5), pelo apoio financeiro essencial para a realização dessa pesquisa.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

À todas as pessoas que direta ou indiretamente, colaboraram para a execução desta pesquisa.

*“Aqueles que se sentem satisfeitos sentam-se e nada fazem.  
Os insatisfeitos são os únicos benfeitores do mundo.”*

**Walter S. Landor**

Domingues NB. Perfil proteômico salivar e degradação de histatinas em indivíduos com síndrome de Down e doença periodontal [tese de doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2019.

## RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar o perfil proteômico e a proteólise da histatina 1 e da histatina 5 na saliva total estimulada de indivíduos com síndrome de Down (SD) e não-sindrômicos (NS) na presença e na ausência da doença periodontal (DP). Foram selecionados 24 indivíduos, os quais foram divididos em 4 grupos experimentais (n=6): SD com DP (SDcDP), SD sem DP (SDsDP), não-sindrômicos com DP (NScDP) e não-sindrômicos sem DP (NSsDP - controle). Inicialmente, os participantes passaram por exame clínico intra-bucal para avaliação da condição periodontal e determinação do índice CPO-D. Foi realizada a coleta da saliva estimulada até a obtenção de 3,0 mL. Parte da saliva foi utilizada para a análise microbiológica e parte foi centrifugada para obtenção do sobrenadante da saliva total (SST), alíquotada e armazenada em freezer -80°C para as análises proteômica e de degradação. Os níveis salivares de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e *Porphyromonas gingivalis* foram quantificados pela Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR). A análise espectrométrica foi realizada com os *pools* de saliva de cada um dos quatro grupos, os quais foram submetidos a nLC-ESI-MS/MS (Cromatografia Líquida por ionização electrospray Tandem Espectrometria de Massas). A degradação proteica foi realizada pela adição de histatina 1 e histatina 5 sintéticas ao SST diluído (1:10) e incubação à 37°C pelos tempos 0, 0,5, 1,5, 4, 6, 8, 24 e 48 horas. Em seguida, foram realizadas as análises de eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) catiônica e mensuração da densidade das bandas (%) das imagens obtidas. Os dados clínicos e microbiológicos foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis, complementado pelo teste de Dunn, e os dados de proteína total e degradação das histatinas foram avaliados por Anova seguida pelos pós-testes de Tukey e Bonferroni, respectivamente ( $\alpha=0,05$ ). Os espectros obtidos na análise proteômica foram confrontados com base de dados específica e apresentados de forma descritiva. Os indivíduos com SD apresentaram redução significativa no fluxo salivar ( $p=0,001$ ). Não houve diferença significativa para o índice CPO-D entre os grupos ( $p=0,158$ ), enquanto que para os parâmetros periodontais diferenças estatísticas foram observadas, entre os grupos sem DP e com DP ( $p\leq 0,003$ ). Com relação a quantidade de bactérias periodontopatogênicas,

não houve diferença entre os grupos para *Aa* ( $p=0,803$ ), por outro lado, níveis significativamente aumentados de *Pg* foram verificados no grupo NScDP em comparação aos grupos sem DP ( $p=0,022$ ). A concentração de proteína total foi significativamente maior no grupo SDcDP ( $p\leq 0,0001$ ). Um total de 1855 proteínas foram identificadas nas amostras de *pool* de saliva, sendo 31 comuns para os quatro grupos, porém com diferentes abundâncias, 11 exclusivas para os indivíduos com SD e 33 exclusivas para a DP. A degradação das histatinas 1 e 5 foi maior na presença da DP ( $p\leq 0,0001$ ). A densidade das bandas sofreu influência do período de incubação ( $p\leq 0,0001$ ) e do tipo de histatina ( $p\leq 0,0001$ ), sendo observada maior taxa de degradação quanto maior o período de incubação e para a histatina 5 comparada à histatina 1. Além disso, foi observada uma maior taxa de degradação da histatina 1 na presença da SD ( $p=0,036$ ). Pode-se concluir que: (1) existem diferenças de abundância de algumas proteínas na presença da SD e da DP, (2) a histatina 1 é mais resistente à proteólise do que a histatina 5, e (3) a degradação das histatinas 1 e 5 ocorre mais rapidamente na presença da DP e apenas a degradação da histatina 1 sofre influência da presença da SD.

**Palavras-chave:** Síndrome de Down. Saliva. Proteólise. Doenças periodontais.

Natalia BD. Salivary proteomic profile and histatins 1 and 5 degradation in individuals with Down syndrome and periodontal disease [tese de doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2019.

## **ABSTRACT**

This study aimed to evaluate the proteomic profile and histatins 1 and 5 proteolysis in stimulated whole saliva of individuals with Down syndrome (DS) and non-syndromics (NS) in the presence and absence of periodontal disease (PD). Twenty-four individuals were selected and divided in the following groups (n=6): DS with PD (DSwPD), DS without PD (DSwtPD), NS with PD (NSwPD) and NS without PD (NSwtPD – control). First, periodontal condition and DMFT index were evaluated and 3.0 mL of stimulated whole saliva was collected. Then, part of whole saliva was used to microbiological analysis and the remaining samples were centrifuged in order to obtain the whole saliva supernatant (WSS), aliquoted and stored at -80°C to proteomic and degradation assays. Levels of *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*) and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*Aa*) were quantified by real-time polymerase chain reaction (qPCR). Spectrophotometric analyses were carried out with saliva pools of each group by using nLC-ESI-MS/MS (Liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry). Protein degradation assay was carried out with synthetic histatins 1 or 5 added to WSS (1:10) followed by samples incubation at 37°C for 0, 0.5, 1.5, 4, 6, 8, 24 and 48 hours. Next, polyacrylamide cationic gel electrophoresis (PAGE) analysis and measurement of bands density (%) were performed. Kruskal-Wallis test complemented by Dunn's test was applied to analyze clinical and microbiological data. Total protein and histatins degradation were evaluated by using Anova followed by Tukey's and Bonferroni post hoc tests, respectively ( $\alpha=0.05$ ). The acquired spectra obtained from proteomic analysis were searched against specific protein database and descriptive statistics was used. Individuals with DS showed reduced salivary flow rate ( $p=0.001$ ). There was no significant differences for the DMFT index between groups ( $p=0.158$ ), while it was noticed significant differences in periodontal parameters between groups with PD and without PD ( $p\leq 0.003$ ). Regarding amounts of periodontopathogenic bacteria, there were no significant differences between groups to *Aa* ( $p=0.803$ ). On the other hand, higher significant levels of *Pg* were verified in NSwPD group compared to groups without PD ( $p=0.022$ ). Total protein concentration was significantly higher in DSwPD

group ( $p \leq 0.0001$ ). A total of 1855 proteins were identified in the pool of saliva samples, being 31 in common to all groups, however with different abundances. It was also verified 11 exclusive proteins in individuals with DS and 33 exclusive proteins in individuals with PD. It was noticed that the degradation occurs faster in the presence of PD for both histatins ( $p \leq 0.0001$ ). Bands density were influenced by incubation period ( $p \leq 0.0001$ ) and by the histatin type ( $p \leq 0.0001$ ). A higher degradation rate of histatin 5 was observed in comparison to histatin 1, and as longer as incubation period the greater was the degradation rate of these histatins. In addition, it was observed a higher degradation rate for histatin 1 in the presence of DS ( $p = 0.036$ ). It can be concluded that: (1) there are differences in the abundance of some proteins in the presence of DS and PD, (2) histatin 1 is more resistant to proteolysis than histatin 5, and (3) histatins 1 and 5 degradation occurs faster in the presence of PD and only histatin 1 degradation is influenced by the presence of DS.

**Keywords:** Down syndrome. Saliva. Proteolysis. Periodontal diseases.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>09</b>
<b>2 PROPOSIÇÃO .....</b>	<b>12</b>
<b>3 REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>13</b>
<b>3.1 Síndrome de Down.....</b>	<b>13</b>
<b>3.2 Doença Periodontal e Síndrome de Down.....</b>	<b>15</b>
<b>3.3 Saliva e Suas Funções na Cavidade Bucal.....</b>	<b>18</b>
<b>3.4 Proteínas Salivares.....</b>	<b>20</b>
<b>3.5 Degradação Proteolítica das Histatinas.....</b>	<b>24</b>
<b>4 MATERIAL E MÉTODO .....</b>	<b>27</b>
<b>4.1 Amostragem .....</b>	<b>27</b>
<b>4.2 Seleção da Casuística.....</b>	<b>27</b>
<b>4.3 Exame Clínico Intrabucal .....</b>	<b>28</b>
<b>4.3.1 Exame clínico periodontal.....</b>	<b>28</b>
<b>4.3.2 Experiência de cárie dentária.....</b>	<b>29</b>
<b>4.4 Coleta da Saliva.....</b>	<b>29</b>
<b>4.5 Quantificação Absoluta de Periodontopatógenos por PCR em Tempo Real (qPCR).....</b>	<b>30</b>
<b>4.6 Análises Salivares.....</b>	<b>31</b>
<b>4.6.1 Análise da proteína total e preparo das alíquotas .....</b>	<b>32</b>
<b>4.6.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) .....</b>	<b>32</b>
<b>4.6.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) catiônica .....</b>	<b>33</b>
<b>4.6.4 Digestão <i>in-solution</i> das proteínas para espectrometria de massas .....</b>	<b>34</b>
<b>4.6.5 Cromatografia líquida por ionização <i>electrospray</i> tandem espectrometria de massas (LC-ESI-MS/MS) .....</b>	<b>34</b>
<b>4.6.6 Ensaio de degradação das histatinas 1 e 5 em SST.....</b>	<b>35</b>
<b>4.6.7 Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) catiônica após ensaio de degradação .....</b>	<b>36</b>
<b>4.7 Análise Estatística.....</b>	<b>37</b>

<b>5 RESULTADO .....</b>	<b>39</b>
<b>5.1 Características Demográficas, Dados Clínicos e Parâmetros Periodontais.....</b>	<b>39</b>
<b>5.2 Quantificação Absoluta de Periodontopatógenos por PCR em Tempo Real (qPCR) .....</b>	<b>42</b>
<b>5.3 Proteína Total e Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (PAGE) em Presença de Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) e Catiônica.....</b>	<b>42</b>
<b>5.4 Identificação das Proteínas - Digestão <i>in-solution</i> .....</b>	<b>46</b>
<b>5.5 Ensaio de Degradação das Histatinas 1 e 5 em SST e Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (PAGE) Catiônica.....</b>	<b>55</b>
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>66</b>
<b>7 CONCLUSÃO .....</b>	<b>73</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>74</b>
<b>APÊNDICE.....</b>	<b>89</b>
<b>ANEXO.....</b>	<b>120</b>

## 1 INTRODUÇÃO

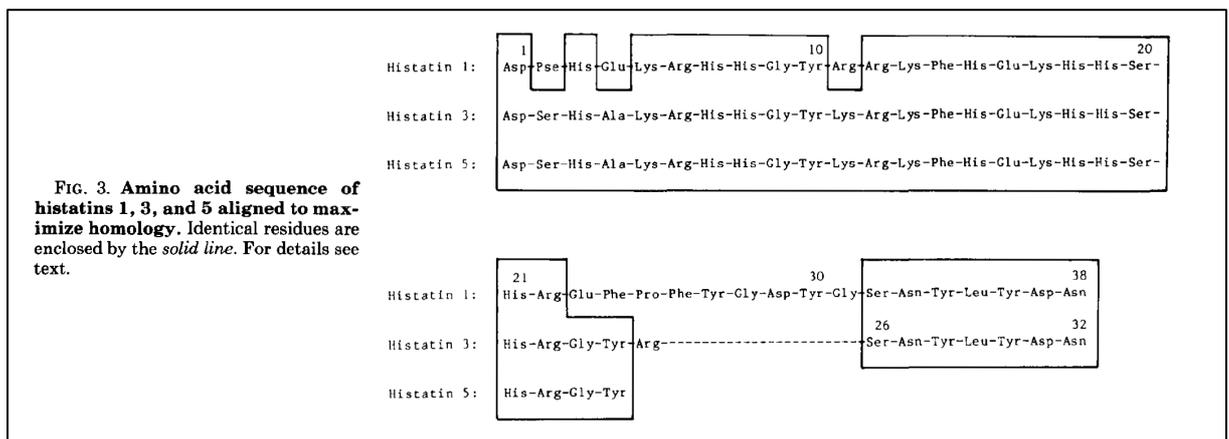
A síndrome de Down (SD), conhecida também como trissomia do cromossomo 21, pode implicar em algumas manifestações bucais como atresia maxilar, palato ogival, pseudomacroglossia, língua fissurada e anomalias dentárias<sup>1,2</sup>. Também está bem estabelecido que indivíduos com SD, quando comparados aos cromossomicamente normais, apresentam fluxo salivar reduzido<sup>3-5</sup>. Além disso, a literatura mostra uma associação entre a SD e a alta prevalência à doença periodontal (DP), a qual afeta estes indivíduos ainda em idade precoce<sup>6-9</sup>. A alta prevalência da DP em indivíduos com SD pode ser explicada devido a fatores de risco sistêmicos como, deficiências imunológicas<sup>10,11</sup> e alterações no sistema de defesa antioxidante<sup>5,12</sup>, associadas a fatores de risco locais como, colonização precoce<sup>13-15</sup> e quantidade aumentada de micro-organismos periodontopatogênicos na cavidade bucal<sup>16,17</sup>, alterações anatômicas dentárias, características salivares e higiene bucal insatisfatória<sup>18</sup>.

A saliva é importante para o desempenho de funções fisiológicas como a mastigação, deglutição e lubrificação de tecidos, e, portanto, para manutenção da saúde da cavidade bucal<sup>19</sup>. Este fluido é também um dos mais complexos do corpo humano, contendo moléculas sintetizadas tanto localmente quanto sistemicamente<sup>20,21</sup>. A composição salivar inclui substâncias derivadas do fluido crevicular, soro e células sanguíneas, células descamadas do epitélio intrabucal e subprodutos bacterianos<sup>21-23</sup>. Isso faz com que a saliva seja considerada uma potencial ferramenta diagnóstica com a vantagem de sua coleta ser não invasiva e de rápida execução, além de provocar desconforto mínimo ao paciente<sup>24</sup>.

Em termos estruturais, na porção orgânica salivar é possível identificar 2290 proteínas<sup>19,25</sup>, entre as quais, se destacam as proteínas ricas em prolina, as amilases, as mucinas, as cistatinas, as estaterinas e as histatinas<sup>19</sup>. O particular interesse no estudo das histatinas se deve ao fato de que estas proteínas possuem propriedades biológicas bem definidas<sup>26-28</sup> e contribuem para a homeostase da cavidade bucal<sup>26,29-32</sup>. Entre as histatinas secretadas, as principais formas encontradas (80%) são as histatinas 1, 3 e 5<sup>29,33</sup>, as quais contêm 38, 32 e 24 resíduos de aminoácidos, respectivamente<sup>29,34</sup> (Figura 1). As histatinas 1 e 3 são codificadas por diferentes genes (*HIS1* e *HIS2*), enquanto que a histatina 5 é derivada da clivagem da histatina 3. As histatinas participam da formação da película

adquirida<sup>31,32</sup>, do processo de tamponamento e desempenham ação antifúngica e antibacteriana<sup>26,30,31,35</sup>. A histatina 1 é a única fosforilada<sup>31</sup> e possui a capacidade de inibir o crescimento de cristais de sais de fosfato de cálcio<sup>29</sup>. A histatina 5, possui forte ação antifúngica, já comprovada por ser a mais eficaz entre as histatinas contra fungos patogênicos como a *Candida albicans*<sup>26,29,35,36</sup>. Além da ação antifúngica, outros estudos in vitro demonstraram efeitos antimicrobianos das histatinas sobre *Streptococcus mutans*<sup>37-39</sup>, e inibição de proteases produzidas por *Porphyromonas gingivalis*<sup>40-43</sup> e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*<sup>44</sup>, apontando claramente a importância destas proteínas na manutenção do equilíbrio da microbiota intrabucal.

**Figura 1** – Sequência de aminoácidos das histatinas 1, 3 e 5.



Fonte: Oppenheim et al. <sup>29</sup>, p.7474.

Estudos conduzidos em seres humanos mostram a eficácia clínica do uso das histatinas, retardando a formação de biofilme e reduzindo a severidade da gengivite<sup>45-47</sup>. Neste contexto, atualmente tem se atribuído a essas proteínas grande potencial para o desenvolvimento de novas terapias contra doenças bucais sem o inconveniente de apresentarem efeitos adversos ao hospedeiro<sup>28,34,48</sup>. Entretanto, o grande fator limitante da ação das histatinas produzidas naturalmente é a discrepância existente entre a concentração destas proteínas nas glândulas salivares e a presença de formas intactas na saliva total<sup>26,49,50</sup>. Desta maneira, o foco principal dos trabalhos está voltado para a degradação proteica das histatinas<sup>26,27,31,32,51,52</sup>, uma vez que a proteólise pode ser considerada a maior responsável pelos baixos níveis de algumas proteínas salivares em sua forma intacta<sup>52</sup>.

A etapa da degradação proteolítica que ocorre na cavidade bucal é desencadeada principalmente por enzimas derivadas de bactérias ou células epiteliais do hospedeiro<sup>51,53,54</sup>. Entretanto, também contribuem para esse processo a formação de complexos proteicos<sup>55</sup>, a interação com células microbianas<sup>56,57</sup> e a ligação das histatinas a tecidos duros e moles<sup>58</sup>. Essa somatória de eventos torna a proteólise extremamente rápida<sup>26,38,51,59</sup> e impossibilita o estudo das várias etapas da degradação proteolítica intraoral<sup>26,52</sup>. Uma alternativa é a utilização do sobrenadante da saliva total (SST) onde a proteólise ocorre cerca de 7,5 vezes mais lentamente<sup>60</sup>, permitindo a visualização das etapas da degradação. Como mencionado anteriormente, as enzimas derivadas de bactérias ou células epiteliais do hospedeiro são a principal causa desencadeante da proteólise na cavidade bucal<sup>51,53,54</sup>, assim, levantou-se a hipótese de que as histatinas degradam com maior facilidade na presença de uma maior quantidade de micro-organismos, especialmente na presença da doença periodontal (DP).

Até o presente momento, o diagnóstico da DP é realizado basicamente por exame clínico e radiográfico. Em alguns casos, o grande desafio para o profissional é diferenciar danos aos tecidos de suporte resultantes de uma DP anterior já resolvida, de uma atual recorrência da mesma<sup>20</sup>, ressaltando-se a importância dos biomarcadores salivares para auxiliar no diagnóstico e contribuindo para prever a atividade da doença. Embora existam na literatura muitos trabalhos abordando biomarcadores para DP na saliva de indivíduos cromossomicamente normais<sup>20-23,61-63</sup>, devido à complexidade desta doença ainda não há evidência suficiente que justifique o uso desses biomarcadores em substituição ao exame clínico. Assim, o desenvolvimento de novas opções de diagnóstico é de grande interesse para identificar precocemente esta condição.

Portanto, o estudo das diferenças nos perfis proteicos salivares e no padrão de degradação das histatinas entre diferentes grupos de indivíduos pode ser promissor como coadjuvante no diagnóstico e tratamento da DP. Além disso, é importante estabelecer se a SD exerce alguma influência nestes processos, já que este é considerado um grupo de risco para o desenvolvimento da DP.

## **2 PROPOSIÇÃO**

Avaliar o perfil proteômico e a proteólise da histatina 1 e histatina 5 na saliva total estimulada de indivíduos com SD e não síndrômicos, na presença e na ausência da DP.

### 3 REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 Síndrome de Down

A síndrome de Down (SD) foi descrita clinicamente pela primeira vez em 1866 pelo médico John Langdon Haydon Down<sup>64</sup>. Em seu trabalho, Down, descreve e classifica as características fenotípicas dos pacientes com retardo mental, aos quais se refere como “*idiots*”, de acordo com padrões étnicos. São citados em sua publicação quatro grupos étnicos distintos a seguir, “*Ethiopian variety*”, “*Malay variety*”, “*American Continent*” e “*Mongolian type*”, sendo a descrição do último extremamente precisa com as características frequentemente presentes na SD e motivo pelo qual esta alteração genética recebeu o nome de Mongolismo naquela época.

Aproximadamente 100 anos após a publicação de John Langdon Haydon Down, a SD finalmente teve sua etiologia definida. Dois grupos de pesquisadores, Lejeune et al.<sup>65</sup>(1959) e Jacobs et al.<sup>66</sup>(1959), realizaram a identificação de um cromossomo extra no par 21 em indivíduos com SD, assim esta anomalia também passou a ser conhecida como trissomia do cromossomo 21. A SD, portanto, é uma desordem genética que acomete 1:1000-1100 nascidos vivos<sup>67</sup> e a manifestação mais comum ocorre na forma de trissomia simples do cromossomo 21, representando aproximadamente 95% dos casos<sup>68</sup>.

A trissomia simples ocorre devido a uma não-disjunção cromossômica durante a primeira ou segunda divisão meiótica, assim, um dos gametas recebe um cromossomo 21 adicional<sup>68,69</sup>. A SD também pode ocorrer por Translocação Robertsoniana ou na forma de Mosaicismo, juntos, representando 5% dos casos. Na primeira situação, o braço longo do cromossomo 21 sofre um rearranjo com o braço curto de outro cromossomo, geralmente o 14 ou 15<sup>68,70</sup>. Já o mosaicismo ocorre devido a divisões mitóticas anormais após a fecundação. O indivíduo afetado é constituído por uma parte das células cromossomicamente normais e outras com um cromossomo adicional, desta maneira apresenta características mais amenas relacionadas à SD<sup>68,70</sup>.

Em 1994, Korenberg et al.<sup>1</sup> realizaram um estudo com uma série de casos de indivíduos com trissomia parcial do cromossomo 21 com a finalidade de identificar e caracterizar os genes deste cromossomo superexpresso e relacioná-los com as características fenotípicas presentes na SD. Este trabalho evidenciou que uma única

região cromossômica não é exclusivamente responsável pelo fenótipo da SD, ou seja, todas as partes do cromossomo 21 são importantes e contribuem de alguma maneira para a determinação das características presentes. A superexpressão dos genes localizados no cromossomo 21 determinam, portanto, o fenótipo frequentemente associado à SD. São observadas nestes indivíduos características como baixa estatura, clinodactilia do quinto dedo da mão, mãos e pés pequenos e largos e prega única palmar<sup>1,71</sup>. Com relação às alterações faciais, são comumente presentes linha palpebral oblíqua, prega epicântica, ponte nasal ampla e achatada e orelhas com baixa implantação<sup>1,72</sup>.

Indivíduos com SD também apresentam deficiência intelectual e atraso no desenvolvimento motor<sup>1</sup>, além de serem comuns algumas alterações sistêmicas. Segundo Abanto et al.<sup>73</sup> (2011), as alterações sistêmicas mais frequentes nos indivíduos com SD, representando respectivamente 100% e 90% dos casos, são a hipotonia muscular e a deficiência imunológica. Na sequência, os autores apontam cardiopatias congênitas como as mais frequentes nestes indivíduos, seguidas por infecções respiratórias e risco aumentado para a ocorrência de leucemia. Também são citadas a presença de instabilidade atlanto-axial, diabetes, hipotireoidismo e maior incidência de convulsões. Outra condição importante e presente em 45% dos indivíduos com SD acima de 40 anos de idade é a doença de Alzheimer<sup>73</sup>, sendo esta fortemente associada ao envelhecimento precoce nestes indivíduos<sup>74</sup>.

Na cavidade bucal dos indivíduos com SD as manifestações incluem atresia maxilar, palato ogival, língua fissurada e pseudomacroglossia, a qual não está relacionada exclusivamente ao tamanho aumentado da língua, mas sim à uma associação entre a cavidade bucal diminuída e a hipotonia muscular generalizada<sup>71,75</sup>. As maloclusões também são muito frequentes, destacando-se a protrusão mandibular, mordida aberta anterior e mordida cruzada posterior<sup>2,76</sup>. Indivíduos com SD podem apresentar anomalias dentárias como agenesias, microdontia, dentes conóides e alterações na cronologia e sequência de erupção dentária<sup>2,71</sup>. Além disso, a literatura tem demonstrado que indivíduos com SD apresentam uma maior prevalência à DP, quando comparados à indivíduos não síndrômicos ou com deficiência mental<sup>6,8,9,18,77,78</sup>.

### 3.2 Doença Periodontal e Síndrome de Down

A DP é uma doença infecto-inflamatória crônica causada, principalmente, pela presença de micro-organismos patogênicos no biofilme que se acumula sobre as superfícies dentárias<sup>79</sup>. Bactérias periodontopatogênicas são capazes de induzir a liberação de citocinas pró-inflamatórias, as quais ativam células do hospedeiro dando início ao processo inflamatório local<sup>80</sup>, além de serem capazes de promover a supressão dos linfócitos<sup>81</sup>. A progressão do processo inflamatório nos tecidos provoca a perda de suporte dentário pela degeneração de tecido conjuntivo e reabsorção óssea alveolar. Assim, a DP, quando instalada, resulta na formação de bolsas periodontais e pode culminar na perda dos elementos dentários<sup>79</sup>.

Sabe-se que a DP moderada afeta a maioria da população adulta mundial<sup>82</sup>, e quando em sua forma severa, é a sexta infecção crônica mais comum no mundo<sup>83</sup>. Em um extenso levantamento realizado nos Estados Unidos entre os anos de 1988 e 1994, os autores estimaram que a DP moderada afetava 21,80% dos adultos norte-americanos, enquanto que 12,60% eram acometidos pelas formas moderada ou severa da doença<sup>84</sup>. De acordo com o “*2017 International Workshop for a Classification of Periodontal Disease and Conditions*” a DP pode ser uma manifestação bucal de doenças sistêmicas associada a desordens genéticas e hematológicas<sup>85,86</sup>. Ainda, sabe-se que esta doença tem seu desenvolvimento e/ou curso de progressão associados a fatores de risco como, fumo, diabetes mellitus, estresse, osteoporose e deficiência na resposta imunológica do hospedeiro e envelhecimento<sup>87</sup>. A DP se manifesta em indivíduos com SD de maneira severa e ainda em idade precoce<sup>6,8,9,18,77,78</sup>, com uma prevalência que pode variar de 70 a 90% em pacientes acima de 30 anos de idade<sup>88</sup>. Sabe-se que a DP é biofilme dependente, entretanto, a alta prevalência desta doença em indivíduos com SD não pode ser associada apenas ao acúmulo de biofilme dentário<sup>89,90</sup>.

Em 1977, Sáxén et al.<sup>89</sup> compararam a perda óssea alveolar entre 35 indivíduos com SD, com idades variando entre 9 e 39 anos e seus controles pareados por idade, gênero e grau de deficiência mental, utilizando radiografia panorâmica. Os autores verificaram reabsorções ósseas iguais ou superiores a 5mm em 69% dos pacientes com SD, enquanto que para o grupo controle esta taxa atingiu apenas 20%. Também observaram que uma perda óssea mais significativa ocorreu nos pacientes com SD a partir dos 19 anos de idade. Os resultados levaram os autores a concluir que os indivíduos com SD apresentam uma maior

prevalência e severidade da DP, a qual não pode ser associada apenas a uma higiene bucal insatisfatória.

Cichon et al.<sup>90</sup> (1998) realizaram o monitoramento da condição clínica periodontal durante 12 semanas em indivíduos com SD e naqueles com paralisia cerebral. Foram avaliados índice de placa, índice gengival, profundidade de sondagem e nível de inserção. Também determinaram o efeito do controle de biofilme e instrução de higiene bucal nestes indivíduos durante o período do estudo. Ao final das 12 semanas, foi verificada melhora nos parâmetros clínicos nos indivíduos com paralisia cerebral e o controle de biofilme teve efeito positivo sobre a sua condição gengival, enquanto que para os indivíduos com SD não observou-se o mesmo efeito. Ficou evidente que a deficiência imunológica nos indivíduos com SD, leva a uma resposta inflamatória exacerbada, que juntamente com o acúmulo de biofilme causa uma destruição periodontal severa.

Conforme ocorre a maturação do biofilme na cavidade bucal, há o aumento da quantidade de micro-organismos anaeróbios gram-negativos, os quais estão fortemente associados com o desenvolvimento da DP<sup>79</sup>. Além disso, vários estudos têm verificado uma quantidade aumentada de bactérias periodontopatogênicas em indivíduos com SD comparados a controles não síndrômicos<sup>14,16,17,91</sup>.

Amano et al.<sup>14</sup> (2000), detectaram bactérias periodontopatogênicas importantes como *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* em amostras de biofilme subgengival de crianças com SD entre 2 e 4 anos de idade. Os autores observaram, ainda, que houve o aumento gradual destas espécies bacterianas com o avanço da idade, em crianças com até 13 anos. Entretanto, analisando estas mesmas espécies no grupo controle, sem SD, verificaram que as bactérias *Porphyromonas gingivalis* e *Treponema denticola* permaneceram ausentes. Sugeriram que a colonização da cavidade bucal por micro-organismos periodontopatogênicos em indivíduos com SD se inicia na primeira infância e que alterações no biofilme com o avanço da idade pode influenciar o desenvolvimento precoce da DP nestes indivíduos.

A presença de micro-organismos patogênicos é essencial para a ocorrência da DP, entretanto é necessário que haja um hospedeiro susceptível para que ela se desenvolva. Vários estudos apontam a deficiência imunológica como uma das causas principais para a elevada prevalência da DP em indivíduos com SD<sup>10,11,18</sup>.

Investigações conduzidas em indivíduos com SD associam a deficiência imunológica destes a uma redução na quimiotaxia de neutrófilos<sup>92</sup>, diminuição na contagem de células B e T<sup>11,93</sup>, defeitos na adesão dos linfócitos<sup>94</sup>, alteração na produção de imunoglobulinas<sup>10,95</sup> e de mediadores inflamatórios<sup>96-98</sup>.

Os indivíduos com SD também apresentam um desequilíbrio entre os sistemas pro e antioxidante<sup>99</sup> e sua relação com o desenvolvimento da DP está bem estabelecida<sup>5,12,100</sup>. Este desequilíbrio ocorre devido a uma produção exacerbada de espécies reativas de oxigênio (EROs)<sup>101</sup>, as quais possuem grande potencial citotóxico, e o seu acúmulo resulta em dano oxidativo aos tecidos locais<sup>102</sup>.

Em estudos longitudinais com duração de 7 anos<sup>7</sup> e de 8,5 anos<sup>103</sup> foram realizados acompanhamentos clínicos periodontais em indivíduos com SD, e verificou-se médias de perdas ósseas anuais de 0,04 mm e 0,03 mm, respectivamente. Além disso, estes estudos observaram que a região anterior inferior foi a mais afetada pela DP. Interessantemente, houve um aumento no número de sítios doentes no decorrer do estudo sem que a composição da microbiota periodontopatogênica se alterasse<sup>7</sup> e a principal causa de perda dentária foi associada à periodontite<sup>103</sup>.

A despeito da elevada prevalência de DP em indivíduos com SD, são raros os trabalhos na literatura abordando o tratamento periodontal nesses indivíduos. Tanaka et al.<sup>91</sup> (2015) compararam o efeito do tratamento periodontal não cirúrgico e os níveis de periodontopatógenos em indivíduos com SD e controles cromossomicamente normais, ambos com DP. Verificaram que o tratamento periodontal não cirúrgico melhorou os parâmetros clínicos de ambos os grupos e não houve diferença significativa entre os mesmos. Com relação aos parâmetros microbiológicos, 45 dias após o tratamento, os níveis de bactérias do complexo vermelho (*Porphyrononas gingivalis*, *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola*) permaneceram elevados nos sítios doentes dos pacientes com SD, o que foi significativamente diferente do grupo controle. Os autores sugeriram que a associação de tratamentos adjuvantes à terapia periodontal convencional se faz necessária para controlar os níveis de periodontopatógenos.

### 3.3 Saliva e Suas Funções na Cavidade Bucal

A saliva desempenha importantes funções relacionadas com a manutenção da homeostase da cavidade bucal, entre elas destacam-se, lubrificação e proteção dos tecidos, capacidade de tamponamento, mineralização das superfícies dentárias, ação antimicrobiana, entre outras<sup>104,105</sup>. A saliva total é uma mistura complexa de fluidos provenientes das glândulas salivares maiores e menores, fluido crevicular, além de conter bactérias orais, debris de alimentos e células descamadas do epitélio intrabucal<sup>21,22,105</sup>.

Indivíduos saudáveis produzem uma média diária de 1,0 a 1,5 L de saliva (0,69 a 1,04 mL/min). As glândulas salivares maiores são as principais contribuintes na secreção deste fluido, e tratando-se do fluxo da saliva total não-estimulada temos participação de 20% das glândulas parótidas, 65% das glândulas submandibulares, 7% a 8% das glândulas sublinguais e menos de 10% das glândulas salivares menores<sup>106</sup>. Entretanto, a participação de cada glândula se altera quando se trata da produção da saliva total estimulada, sendo a parótida responsável por uma contribuição de aproximadamente 60%<sup>107</sup>. A saliva produzida pelas glândulas salivares menores possui alto teor de mucinas e imunoglobulinas quando comparada àquela produzida pelas glândulas salivares maiores. Logo, apesar de contribuírem com baixos volumes de fluido secretado, essas glândulas são consideradas importantes para lubrificação e proteção dos tecidos bucais, bem como, para a resposta imune local<sup>108</sup>.

A capacidade tampão salivar é a propriedade que corrige alterações de pH causadas pela liberação de íons ácidos ou básicos, por exemplo, provenientes da fermentação de carboidratos. Os principais sistemas tamponantes salivares são o sistema bicarbonato e o sistema fosfato<sup>109</sup>. O sistema bicarbonato é o mais efetivo entre eles, uma vez que o  $\text{HCO}_3^-$  possui a capacidade de se difundir pelo biofilme e atua na neutralização dos ácidos. Sua excelente ação tamponante pode ser atribuída devido ao aumento das concentrações deste composto com o aumento do fluxo salivar nas secreções das glândulas salivares maiores<sup>110</sup>. Em momentos de baixo fluxo salivar o sistema bicarbonato é ineficaz e então, a capacidade tampão é exercida pelo sistema fosfato<sup>105</sup>. Apesar da concentração de fosfato aumentar com a redução do fluxo salivar, a efetividade deste sistema é reduzida, uma vez que a

maior parte deste composto já está na forma  $H_2PO_3$  e não é capaz de assumir um íon hidrogênio extra<sup>104</sup>.

Outra importante função da saliva é a de manter a integridade dos elementos dentários, atuando nos processos de desmineralização e remineralização. A difusão dos ácidos produzidos pelas bactérias na estrutura dental pode levar a dissolução dos cristais de hidroxiapatita, a qual ocorre em um pH crítico entre 5 e 5,5. A capacidade tampão da saliva exerce grande influência sobre o pH do biofilme dental, além disso, a supersaturação de minerais no fluido salivar é essencial para o processo de remineralização da superfície do esmalte, inibindo a instalação e progressão da cárie<sup>111</sup>.

A alta concentração de minerais na saliva é mantida pela ação de algumas proteínas, como por exemplo a estaterina, que estabiliza as concentrações de cálcio e fosfato, impedindo a precipitação espontânea de fosfato de cálcio<sup>112</sup> e também está envolvida com o início da formação da película adquirida<sup>104,105</sup>. Além da estaterina, outras proteínas salivares como as histatinas, cistatinas e proteínas ricas em prolina estão presentes na película adquirida, a qual permite a difusão de minerais como o cálcio e o fosfato contribuindo para o processo de remineralização do esmalte<sup>104,105</sup>.

Com relação a ação antimicrobiana, a saliva apresenta componentes imunológicos caracterizados pelas imunoglobulinas, que representam uma das primeiras linhas de defesa contra antígenos<sup>113</sup>. A função primária das imunoglobulinas é inativar bactérias, fungos e vírus por meio da ligação ou aglutinação com estas partículas, prevenindo assim, a adesão das mesmas na mucosa oral<sup>114</sup>. As duas maiores classes de imunoglobulinas presentes na saliva humana são a imunoglobulina A (IgA) e imunoglobulina G (IgG), entretanto também estão presentes em frações menores outras imunoglobulinas como IgM, IgD and IgE<sup>113</sup>. A IgA é a mais abundante entre as imunoglobulinas da saliva e é produzida principalmente por células plasmáticas locais, embora também possa ser derivada do soro sanguíneo, assim como a IgG, sendo o fluido crevicular o canal de entrada destas imunoglobulinas para a cavidade bucal<sup>105,113</sup>. A ação antimicrobiana também é marcada pelos componentes não imunológicos que compreendem as proteínas salivares, as quais serão melhor descritas a seguir.

### 3.4 Proteínas Salivares

A saliva total contém uma variedade enorme de proteínas, entre as quais temos as principais famílias que compreendem amilase, cistatinas, mucinas, estaterina, proteínas ricas em prolina (PRPs) e histatinas<sup>113</sup>. Estas proteínas atuam individualmente ou em conjunto, desempenhando diversas funções como ação antimicrobiana, formação da película adquirida, adesão e/ou *clearance* de microorganismos, proteção aos elementos dentários, entre outras<sup>104,113</sup>.

A  $\alpha$ -amilase é a proteína mais predominante na saliva humana e é produzida principalmente nas glândulas parótidas<sup>31</sup>. Uma de suas funções mais amplamente conhecidas é a de iniciar a digestão de amido e glicogênio na cavidade bucal pela hidrólise das ligações  $\alpha$ -1,4-glicosídicas<sup>31,113</sup>. Devido a sua elevada abundância, a  $\alpha$ -amilase também está presente na película adquirida e no biofilme dentário<sup>115-117</sup>, e participa do processo de adesão de bactérias sobre a superfície dos elementos dentários<sup>117</sup>. Por outro lado, a  $\alpha$ -amilase, em solução, mostrou possuir alta afinidade por algumas espécies de estreptococos<sup>118-120</sup>, apontando sua importância no processo de *clearance* bacteriano, uma vez que a interação entre esta proteína e as bactérias impede as mesmas de se aderirem ao biofilme dentário<sup>117</sup>.

As cistatinas compreendem a família de inibidores de proteases de cisteína, entre as quais, sete estão presentes na saliva: cistatina-A, cistatina-B, cistatina-C, cistatina-D, cistatina-S, cistatina-AS e cistatina-SN<sup>121</sup>. Estas proteínas são produzidas em maior quantidade nas glândulas submandibulares, mas também são encontradas na secreção das parótidas e no fluido crevicular<sup>113,122</sup>. As cistatinas são capazes de bloquear a ação de proteases endógenas e bacterianas<sup>121</sup>. Além disto, está associado às cistatinas C e S a capacidade de inibir o crescimento de *Porphyromonas gingivalis*<sup>123</sup> e às cistatinas S e SN a capacidade de se ligarem a bactérias e lipopolissacarídeos que são frequentemente responsáveis pela destruição tecidual associada às reações inflamatórias<sup>124</sup>. Ainda, a literatura tem mostrado que pacientes com doença periodontal podem apresentar níveis mais elevados de cistatina-C comparado a indivíduos periodontalmente saudáveis, como mecanismo preventivo no processo de degradação dos tecidos periodontais<sup>125,126</sup>.

O terceiro grupo mais abundante de proteínas na saliva total são as mucinas, sendo a MUC5 e a MUC7 as mais importantes<sup>113</sup>. Estas proteínas são altamente

glicosiladas, com a MUC5 apresentando peso molecular superior a 1000 kDa, enquanto que a MUC7 possui um peso molecular bem inferior, variando entre 180 e 200 kDa<sup>113</sup>. As mucinas são secretadas pelas glândulas submandibular, sublingual e glândulas salivares menores e possuem como funções principais evitar o ressecamento do epitélio, minimizar injúrias de natureza mecânica aos tecidos e atuar contra micro-organismos<sup>31</sup>.

As mucinas formam uma camada viscoelástica, de pelo menos 10 a 22 µm, que recobre todas as superfícies da cavidade bucal, agindo como um importante lubrificante durante os processos de mastigação, deglutição e fala<sup>104</sup>. A alta viscosidade salivar pode ser atribuída principalmente a MUC5, a qual tem a capacidade de formar um gel viscoelástico hidrofílico devido à grande quantidade de cadeias de oligossacarídeos<sup>113</sup>, o que a torna um lubrificante muito efetivo. A MUC5 pode contribuir para minimizar a sensação de xerostomia, uma vez que foi demonstrado em estudo piloto que indivíduos expostos a radioterapia de cabeça e pescoço, sem sintomas de xerostomia ou com xerostomia moderada, apresentavam níveis mais elevados de MUC5 na saliva submandibular em comparação aos indivíduos com xerostomia severa<sup>127</sup>. Ainda, a MUC5 tem a capacidade de formar complexos proteicos<sup>31</sup>, o que justifica a sua participação em todos os estágios da formação da película adquirida<sup>115</sup>.

Propriedades antimicrobianas também estão presentes nas mucinas, especialmente na MUC7<sup>121</sup>, a qual apresenta a capacidade de aglutinar espécies bacterianas, fúngicas e virais<sup>113,121</sup>. Já foi demonstrado que uma sequência de 23 resíduos de aminoácidos provenientes da MUC7 exibiram atividade antibacteriana contra *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Streptococcus gordonii* e *Streptococcus mutans*<sup>128</sup>. A literatura também apresenta uma associação entre baixos níveis salivares de MUC7 e pacientes com periodontite, e esta proteína apresenta níveis três vezes menores nos indivíduos com periodontite associada à *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* do que os controles periodontalmente saudáveis<sup>129</sup>. Além disso, também foi demonstrado que o peptídeo derivado do N-terminal da MUC7 apresenta ação antifúngica contra *Candida albicans*<sup>130,131</sup>.

A estaterina é uma proteína fosforilada rica em prolina e tirosina com baixo peso molecular, sintetizada e secretada pelas glândulas parótidas e

submandibulares<sup>31</sup>. Esta proteína é bastante susceptível a degradação proteolítica, o que somado a sua elevada afinidade às superfícies dentárias explica os baixos níveis de estaterina na saliva total<sup>31</sup>. A estaterina é responsável por inibir a precipitação primária e secundária de fosfato de cálcio, ou seja, evita a precipitação espontânea destes sais que estão supersaturados na saliva, bem como inibe o crescimento de cristais deste composto<sup>112,132,133</sup>. Devido a sua alta afinidade pela hidroxiapatita, a estaterina é uma das proteínas precursoras no desenvolvimento da película adquirida e foi verificado que a sua abundância se mantém constante durante todo este processo<sup>115</sup>. Outra propriedade da estaterina é a inibição do crescimento de bactérias anaeróbias, função atribuída ao C-terminal desta proteína<sup>104,121</sup>. A estaterina ainda atua inibindo a adesão de *Streptococcus mutans* à superfície dentária<sup>134</sup> e contribui para a defesa do hospedeiro contra fungos<sup>113</sup>. Foi observado que a estaterina induz a transição de hifa (forma mais invasiva dos fungos) à levedura em cepas de *Candida albicans*, podendo participar da modulação da candidose oral<sup>135</sup>.

As proteínas ricas em prolina (PRPs) constituem aproximadamente 30% da fração proteica da saliva produzida pelas glândulas parótidas e submandibulares, são altamente fosforiladas e compreendem os subtipos: PRPs ácidas (aPRPs), PRPs básicas (bPRPs) e PRPs glicosiladas (gPRPs)<sup>31,136</sup>. A heterogeneidade dessas proteínas tanto na sequência primária de aminoácidos, quanto no tamanho e modificações pós-traducionais sugere a existência de uma diversidade funcional significativa<sup>31</sup>. Já foi verificado que as aPRPs se ligam ao hidróxido de cálcio, isto é, possuem grande afinidade com a hidroxiapatita e assim inibem o crescimento de cristais de fosfato de cálcio em soluções supersaturadas<sup>31</sup>, e participam da formação da película adquirida<sup>113,115</sup>. Ambas, aPRPs e bPRPs, estão presentes na película adquirida<sup>115</sup> e ligam-se às espécies bacterianas e fúngicas, modulando a adesão microbiana às superfícies dentárias<sup>113</sup>. Com relação às gPRPs, foi proposta a sua atuação como lubrificante na cavidade bucal<sup>137</sup>.

As histatinas são proteínas catiônicas secretadas pelas glândulas salivares maiores, apresentam baixo peso molecular e são ricas do aminoácido histidina<sup>31</sup>. Estas proteínas exercem diversas funções como, ação antibacteriana e antifúngica<sup>26,30,31,35</sup>, participam da formação da película adquirida<sup>115</sup>, atuam favorecendo a cicatrização tecidual<sup>104</sup> e ainda agem na proteção do esmalte durante

o processo de desmineralização<sup>138</sup>. Entre as histatinas secretadas, as três formas principais encontradas são a histatina 1 (38 resíduos de aminoácidos), histatina 3 (32 resíduos de aminoácidos) e histatina 5 (24 resíduos de aminoácidos)<sup>33,34</sup>. Os genes *HIS1* e *HIS2* são responsáveis por codificar as histatinas 1 e 3, respectivamente, enquanto que a histatina 5 é derivada de modificações pós-translacionais proteolíticas da histatina 3<sup>31</sup>.

A maior ação antifúngica é observada para a histatina 5, a qual exibe efeito sobre *Candida albicans*<sup>26,35,36</sup> e *Cryptococcus neoformans*<sup>139</sup>. Além disso, também foi verificado que a histatina 5 age de forma sinérgica com drogas antifúngicas<sup>140</sup>. A literatura também apresenta as histatinas como potenciais agentes antibacterianos, sendo demonstrada ação frente a bactérias como *Streptococcus mutans*<sup>37-39</sup>, *Porphyromonas gingivalis*<sup>40-44</sup> e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*<sup>44</sup>. Foi comprovado clinicamente em seres humanos, a segurança e eficácia do uso tópico das histatinas, as quais foram aplicadas na forma de enxaguatório bucal e formulação em gel e mostraram efeito na redução de biofilme, diminuição do sangramento gengival e melhora do quadro de gengivite<sup>45-47</sup>.

As histatinas também se relacionam com a doença periodontal devido à sua propriedade de cicatrização de feridas<sup>141,142</sup> e ação sobre metaloproteinases<sup>42</sup>. Tem-se demonstrado que a histatina 1 é a mais envolvida no processo de cicatrização dos tecidos, estimulando a migração de células epiteliais e fibroblastos ao local da injúria<sup>141,142</sup>. Boink et al.<sup>143</sup> (2016) verificaram o efeito positivo das histatinas sobre a migração celular em células estromais mesenquimais derivadas da derme, tecido adiposo e tecido gengival, afirmando o efeito benéfico deste peptídeo no processo de cicatrização. Os autores também sugerem a utilização das histatinas como novos agentes terapêuticos na cicatrização de feridas cutâneas<sup>143</sup>. Com relação às metaloproteinases, são um grupo de enzimas que agem em conjunto promovendo a degradação da maioria das proteínas da matriz extracelular, crescimento e renovação tecidual normal. Estas encontram-se em níveis elevados em indivíduos com doença periodontal<sup>144</sup>, o que corrobora com os processos de inflamação e destruição tecidual indesejados. Nesse sentido, foi verificado que as histatinas são capazes de inibir as metaloproteinases derivadas do hospedeiro, apresentando ação principalmente sobre as MMP-2 e MMP-9<sup>42</sup>.

### 3.5 Degradação Proteolítica das Histatinas

Como descrito anteriormente, as histatinas são peptídeos catiônicos que desempenham diversas funções, contribuindo notoriamente para a homeostase da cavidade bucal<sup>31,33</sup>. Curiosamente, foi verificado que a saliva é o único fluido do corpo humano em que estes peptídeos estão presentes<sup>145</sup>, entretanto, existe uma discrepância entre a concentração das histatinas na saliva total comparada às secreções em nível glandular<sup>31,51</sup>. Após serem secretadas, as histatinas participam de interações com proteínas<sup>27,55,146</sup>, micro-organismos<sup>56,57</sup> e com os tecidos duros e moles<sup>27,138,147</sup>. Estes processos contribuem, em parte, para que haja uma redução da concentração das histatinas na saliva total, sendo importante salientar que estas interações podem provocar mudanças estruturais macromoleculares, modulando e/ou modificando a função original da proteína. Por exemplo, foi verificado in vitro que o complexo proteico entre a amilase e a histatina 1 mantém a função original de digestão de carboidratos da amilase, enquanto que a propriedade antifúngica atribuída à histatina 1 é reduzida<sup>27</sup>. Além disso, também foi demonstrado que a histatina 1 resiste por maior tempo à proteólise quando forma complexos com a amilase<sup>27</sup>. Em outro estudo in vitro, os autores também verificaram redução da atividade antifúngica da histatina 5 contra *Candida albicans*, quando associada com a amilase<sup>148</sup>.

Apesar da grande complexidade do fluido salivar e da riqueza de possibilidades de interações entre as moléculas, a proteólise tem sido a maior responsável pelos baixos níveis das histatinas em sua forma intacta na saliva total quando comparado à secreção salivar em nível glandular<sup>51,52,59</sup>. Foi verificado que a concentração de histatina na secreção das glândulas parótidas varia entre 30 e 55 µg/mL e, na secreção das glândulas submandibulares e sublinguais, atinge valores de concentração entre 13 e 70 µg/mL<sup>31</sup>. Em contrapartida, a concentração de histatina na saliva total varia de 2 a 8 µg/mL<sup>31</sup>. Inicialmente, a biossíntese das proteínas salivares compreende processos proteolíticos pós-translacionais, os quais ocorrem no interior das glândulas salivares<sup>54</sup>. Assim, foi verificado que uma ínfima atividade proteolítica acontece em nível glandular, entretanto, este processo não é fisiologicamente relevante tendo em vista que a saliva permanece no interior do ducto salivar por um curto período de tempo<sup>26</sup>. O segundo nível da proteólise e o mais significativo ocorre na cavidade bucal e é desencadeado por enzimas derivadas

de bactérias ou células epiteliais do hospedeiro<sup>51,53,54</sup>. Foi observado ainda que a degradação das proteínas ocorre 7,5 vezes mais rapidamente na saliva total do que no SST(sobrenadante da saliva total), demonstrando mais uma vez que a maior atividade das proteases na saliva é proveniente de células do hospedeiro ou está associada às bactérias orais<sup>60</sup>. O processo de proteólise é extremamente rápido e eficaz, o que justifica a impossibilidade de detectar eletroforeticamente, cromatograficamente ou por ensaios imunoquímicos as histatinas salivares em sua forma nativa na saliva total<sup>49,149</sup>. Desta maneira, é indicada a utilização do SST diluído como alternativa para retardar a proteólise e possibilitar o estudo das várias etapas da degradação destas proteínas na cavidade bucal<sup>52,60</sup>, bem como, a caracterização dos produtos por espectrometria de massas e a investigação da atividade biológica e funcional destas sequências de peptídeos<sup>26,32,52,60</sup>.

A análise por espectrometria de massas, permitiu a identificação de diferentes sequências de peptídeos derivadas da histatina 1 em amostras de SST, sendo que Sun et al.<sup>60</sup> (2009) identificaram 5 fragmentos, enquanto que McDonald et al.<sup>32</sup> (2011) observaram 8 fragmentos diferentes. Para a histatina 5, os trabalhos também apresentam diferentes quantidades de peptídeos identificados, sendo encontrados 17 fragmentos por Sun et al.<sup>60</sup> (2009), e 19 fragmentos por Helmerhorst et al.<sup>26</sup> (2006). Em estudo sobre a análise da estrutura e função das proteínas salivares, foi demonstrado que nem sempre a proteína inteira é necessária para manter algum nível de atividade<sup>33</sup>. Algumas sequências de resíduos de aminoácidos específicos são capazes de exercer bioatividade<sup>26,51,150</sup>. Neste sentido, foi observado que o domínio bioativo das histatinas está localizado na região central, mais precisamente, compreendendo os resíduos de aminoácidos nas posições 12-14<sup>150</sup>. Além disso, foram identificados dois sítios de clivagem primária, os resíduos Arg<sup>13</sup> e Arg<sup>17</sup>, alvos preferenciais das proteases na histatina 1 e na histatina 5<sup>60</sup>. Ainda assim, foi verificado que as clivagens primárias não afetam as propriedades de cicatrização de feridas e atividade antifúngica das histatinas, sugerindo que a atividade funcional destas proteínas é mantida na cavidade bucal mesmo após a proteólise<sup>60</sup>. Corroborando com este princípio, Helmerhorst et al.<sup>26</sup> (2006), também verificaram que os produtos finais da degradação da histatina 5 mantiveram atividade contra *Candida albicans*. A manutenção da atividade antifúngica também foi observada no

menor fragmento derivado da histatina 5, o P-113, produto composto por 12 aminoácidos (AKRHHGYKRKFH) localizado no sentido da região do N-terminal<sup>151</sup>.

Assim, é de grande relevância o entendimento da proteólise intrabucal e a caracterização de seus subprodutos, facilitando a seleção dos peptídeos de interesse para análise funcional adicional e permitindo o estudo de estratégias para prolongar o tempo de retenção destes peptídeos bioativos na cavidade bucal.

## 4 MATERIAL E MÉTODO

### 4.1 Amostragem

Segundo os dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística em 2010<sup>152</sup>, existem 116.467 adultos com idades entre 20 e 55 anos na cidade de Araraquara. Para determinar o número amostral foi considerada a prevalência da SD como 0,1%<sup>67</sup>. Para o cálculo da amostra do grupo SD, foi utilizado precisão de 3% (d), número da população de referência de 116.467 (N), valor-limite da área de rejeição de 1,96 (z) e a prevalência esperada para o fenômeno a ser investigado (P), no caso 0,1% para SD.

Fórmula:

$$n = \frac{N \cdot z^2 \cdot P (100 - P)}{d^2 \cdot (N - 1) + z^2 \cdot P(100 - P)}$$

Foi obtido um “n” igual a 5 indivíduos e a esse resultado foram acrescentados 20% para compensar eventuais perdas, chegando-se ao tamanho final aproximado da amostra de 6 indivíduos com SD. Para os demais grupos, o número amostral foi o mesmo e as amostras foram pareadas por gênero.

### 4.2 Seleção da Casuística

A aprovação para a realização deste estudo foi obtida junto ao Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP (CAAE: 56686416.0.0000.5416 - Parecer nº 1.603.989) (ANEXO A). Os participantes não sindrômicos foram selecionados nas clínicas de ensino desta mesma instituição e os SD em escolas para pacientes com necessidades especiais da cidade de Araraquara. Todos tiveram histórico médico e odontológico avaliados.

Foram selecionados um total de 24 indivíduos, de ambos os gêneros e qualquer etnia, dentro da faixa etária de 20-55 anos de idade, os quais foram divididos em 4 grupos de pesquisa, sendo: 6 indivíduos com SD e com DP (Grupo SDcDP), 6 indivíduos com SD e sem DP (Grupo SDsDP), 6 indivíduos não sindrômicos com DP (Grupo NScDP) e 6 indivíduos não sindrômicos sem DP (Grupo NSsDP - controle). Todos os indivíduos selecionados possuíam no mínimo quinze dentes na cavidade oral (excluindo os terceiros molares). Não foram incluídos

indivíduos com alterações sistêmicas (diabetes mellitus, desordens cardiovasculares não controladas, doença auto-imune, líquen plano), fumantes, que faziam uso crônico de álcool, gestantes ou lactantes, mulheres em fase de menopausa, indivíduos com história de tratamento periodontal nos últimos 6 meses, que passaram por tratamento radioterápico de cabeça e pescoço, que utilizaram anti-inflamatórios e/ou imunossupressores nos últimos 3 meses, que faziam uso contínuo de medicamentos beta-bloqueadores, com comportamento não colaborador e indivíduos com SD do tipo mosaico. Os objetivos desta pesquisa foram explicados àqueles que preencheram os critérios de seleção estabelecidos e aos pais e/ou responsáveis no caso dos indivíduos com SD. Em seguida, estes foram convidados a assinar o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (APÊNDICE A) e o Termo de Assentimento (APÊNDICE B).

### **4.3 Exame Clínico Intrabucal**

Os voluntários passaram por exame clínico intrabucal para a avaliação da condição periodontal e experiência de cárie dentária. Este exame foi realizado por um único examinador calibrado (N.B.D.), obtendo-se valores de  $\kappa=0,83$  e  $\kappa=0,89$ , para o exame clínico periodontal e índice CPO-D, respectivamente.

#### **4.3.1 Exame clínico periodontal**

O exame clínico periodontal foi realizado em cadeira odontológica sob a luz do refletor, utilizando-se sonda milimetrada Williams (SSWhite Duflex, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e espelho bucal plano (SSWhite - Duflex, Rio de Janeiro, RJ, Brasil). Inicialmente foram avaliados os índices de placa visível (IPV) e de sangramento marginal (SM), seguido pela profilaxia dos elementos dentários com escova de Robinson e pasta profilática (Herjos - Coltene, Bonsucesso, RJ, Brasil).

A avaliação periodontal dos pacientes foi realizada em seis sítios (mesio-vestibular, vestibular, disto-vestibular, mesio-lingual, lingual e disto-lingual) por elemento dentário (com exceção dos terceiros molares) de acordo com o periograma adotado pela disciplina de Periodontia da FOAr – UNESP (ANEXO B), composto pelos seguintes índices:

- Profundidade de sondagem (PS): medida dada em milímetros que compreende a distância entre a margem gengival e o fundo do sulco ou bolsa periodontal.
- Sangramento à sondagem (SS): observação de sangramento até 10 segundos após a remoção da sonda do sulco ou bolsa periodontal, sendo classificado como presente ou ausente.
- Nível gengival (NG): medida dada em milímetros que compreende a distância entre a margem gengival e a junção amelo-cementária, sendo positiva para hiperplasia e negativa nos casos de recessão gengival.
- Nível de inserção (NI): distância entre a junção amelo-cementária e o fundo do sulco ou bolsa

A DP crônica foi considerada em pacientes com  $PS \geq 4\text{mm}$ , presença de SS e com  $NI > 3\text{mm}$  em oito sítios ou mais não adjacentes<sup>86</sup>.

#### **4.3.2 Experiência de cárie dentária**

Após o exame clínico periodontal, foi realizada a quantificação dos dentes permanentes em cariados, perdidos e obturados (índice CPO-D) de acordo com os critérios da Organização Mundial de Saúde (OMS)<sup>153</sup> (ANEXO C), utilizando-se espelho bucal plano e sonda exploradora nº 5 (Duflex - SS White, Rio de Janeiro, RJ, Brasil).

#### **4.4 Coleta da Saliva**

Para minimizar as variações do ciclo circadiano, a saliva total estimulada pela mastigação de um pedaço de *Parafilm*, foi coletada entre 9 e 11 horas da manhã, após um período de jejum mínimo de 2 horas. A saliva produzida nos primeiros 10 segundos foi descartada e, então, foi prosseguida a coleta utilizando sugador portátil a vácuo (Aspiramax modelo MA520-60, São Paulo, SP, Brasil), adaptado a uma sonda e tubo coletor mantido em gelo<sup>3</sup>, até a obtenção de 3,0 mL. A coleta foi realizada por um período máximo de 15 minutos, com a finalidade de evitar alterações na composição salivar. Em seguida, uma parte da saliva (200  $\mu\text{L}$ ) foi utilizada para análise microbiológica e o restante da amostra foi centrifugada a

16.000 x g (Centrífuga 5504R – Eppendorf, Hamburgo, Alemanha), a 4°C por um período de 10 minutos para separar bactérias, células e resíduos. A saliva total e o SST foram separados em alíquotas de 500 µL em microtubos de 2,0 mL (Eppendorf Safe-Lock – Eppendorf, Hamburgo, Alemanha), e armazenados em freezer a -80°C até a realização das análises.

#### **4.5 Quantificação Absoluta de Periodontopatógenos por PCR em Tempo Real (qPCR)**

As amostras de saliva não centrifugadas previamente armazenadas em freezer -80°C foram descongeladas. O DNA genômico humano e microbiano foi extraído e purificado utilizando-se o kit *Wizard® Genomic DNA Purification* (PROMEGA, Madison, WI, Estados Unidos). A concentração de DNA foi determinada por espectrofotometria de luz UV (Biomate 3 – Thermo Electron Corporation, Winconsin, Estados Unidos) a 260 nm, e a relação entre as absorbâncias a 260 nm e 280 nm (A260/280), foi considerada adequada entre 1,8-2,0. Este DNA serviu como molde para a quantificação dos micro-organismos *Porphyromonas gingivalis* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* por qPCR.

Para a quantificação absoluta, foram utilizados plasmídeos recombinantes albergando uma cópia do gene 16SrRNA de amostras de referência de *Porphyromonas gingivalis* W83 e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* JP2. Estes foram construídos e gentilmente fornecidos para este trabalho, pelo grupo de pesquisa coordenado pela Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Marcia Pinto Alves Mayer do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (USP). Os plasmídeos foram obtidos de acordo com a seguinte metodologia: as bactérias alvo foram cultivadas em meios específicos, em anaerobiose, as colônias resuspensas em água estéril e o DNA extraído.

Para a reação de amplificação foi utilizada Taq DNA Polymerase Platinum (Invitrogen, São Paulo, Brasil), de acordo com as instruções do fabricante. Foi usado DNA molde das amostras de referência, e os iniciadores espécie específicos complementares a 16SrRNA de *Porphyromonas gingivalis* (5' TGT AGA TGA CTG ATG GTG AAA ACC 3' e 5'ACG TCA TCC CCA CCT TCC TC 3')<sup>154</sup> e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (5' GGC ACG TAG GCG GAC CTT 3' e 3' ACCAGGGCTAAAGCCCAATC5')<sup>155</sup>, originando produtos de 197 pb e 80 pb respectivamente. Os amplicons gerados foram clonados utilizando o kit TOPO TA

Cloning version R (Invitrogen, Carlsbad, CA, Estados Unidos) de acordo com as instruções do fabricante. Para confirmação da identidade, os insertos foram sequenciados utilizando iniciadores existentes no vetor (M13 Reverse: CAG GAA ACA GCT ATG AC).

A quantificação de cada espécie nas amostras estudadas foi realizada por meio de qPCR em reações usando os mesmos pares de primers complementares a 16SrRNA de cada espécie bacteriana, utilizando o termociclador SDS 7500 (Applied Biosystems, São Paulo, Brasil). Os produtos foram detectados por fluorescência usando o SYBR Green Power Kit (Applied Biosystems, São Paulo, Brasil), seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante. A quantificação foi feita de forma absoluta por meio da realização em cada placa de uma curva padrão usando diluições seriadas com 5 concentrações conhecidas do DNA molde da bactéria de referência e um controle negativo (água em lugar de DNA), em triplicata. As reações foram realizadas em placas de 96 poços, usando um volume total de 22 µl em cada poço, sendo 1 µl de DNA da amostra (ou do padrão ou do controle negativo), 11 µl de SYBR Green mix e 100 nM de primer Reverse e primer Forward para *Porphyromonas gingivalis* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

O seguinte protocolo térmico foi adotado: 95°C durante 10 min, seguido por 40 ciclos de desnaturação a 95°C durante 15 s, anelamento a 60°C durante 1 min e extensão a 95°C durante 15 s. A análise da curva de *melting* foi realizada a 65-95°C para confirmar se os produtos de PCR das amostras e dos plasmídeos de referência (padrões) apresentam curvas de *melting* idênticas. Os resultados das corridas foram analisados com auxílio do software SDS 7500 (Applied Biosystems, São Paulo, Brasil), de modo que a quantidade de bactérias em cada amostra foi obtida em função da curva padrão do referido micro-organismo. As curvas padrão utilizadas apresentaram valor mínimo de  $R^2=0,90$  e eficiência de amplificação entre 90% e 110%. Os resultados foram expressos em números de cópias do gene 16SrRNA<sup>91</sup>.

#### 4.6 Análises Salivares

As análises salivares, a seguir descritas, foram desenvolvidas em parceria com a Universidade de Western – Ontario, Canadá, na Schulich School of Medicine & Dentistry em colaboração com o Prof. Dr. Walter Luiz Siqueira.

#### 4.6.1 Análise da proteína total e preparo das alíquotas

A análise da proteína total nas amostras de SST foi realizada em duplicata utilizando-se o ensaio do ácido bicinconínico (BCA) (Pierce Chemical, Rockford, IL, Estados Unidos), o qual é composto pelo reagente A (carbonato de sódio, bicarbonato de sódio, ácido bicinconínico e tartarato de sódio em hidróxido de sódio 0,1M) e pelo reagente B (solução aquosa de sulfato de cobre 4% m/v). Neste ensaio, a albumina sérica bovina (BSA) foi utilizada como padrão e a água destilada como branco.

Para confecção da curva padrão foram usadas 8 diferentes concentrações da BSA (25µg/mL, 125 µg/mL, 250 µg/mL, 500 µg/mL, 750 µg/mL, 1.000 µg/mL, 1.500 µg/mL, 2.000 µg/mL). Em uma placa de 96 poços, foi pipetado em cada poço 25 µL de cada concentração da curva padrão, 25 µL da amostra ou do branco, com 200 µL do *Work Reagent* (reagentes A + reagente B). Em seguida, essa placa foi incubada a 37°C durante 30 min. Após o período de incubação, aguardou-se que a mesma atingisse temperatura ambiente e prosseguiu-se com a leitura da absorbância em espectrofotômetro em um comprimento de onda de 560 nm durante 10 segundos. As médias dos valores de absorbância de cada amostra foram convertidas em concentração de proteína total por mililitro de saliva e expressos em mg/mL de saliva.

A partir da obtenção dos valores de concentração de proteína total de cada amostra foram calculados os volumes necessários para obtenção de alíquotas contendo 20µg de proteína cada. Estas alíquotas foram destinadas para as corridas iniciais de Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE) e Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (PAGE) Catiônica que se fizeram necessárias para verificar a presença e qualidade proteica e confirmar a ausência das histatinas nas amostras de SST, respectivamente.

#### 4.6.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

O método de eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) em presença de dodecil sulfato de sódio (SDS) permite a separação das proteínas de acordo com o seu peso molecular. A realização desta corrida foi necessária para avaliação da qualidade das amostras de SST. Um total de 20 µg de proteína por amostra (de

cada paciente) foi ressuspensa em 20 µL de tampão (0,4 M Tris-HCl pH 6,8, 2% SDS, 20% glicerol, 165 mM ditioneitol (DTT), 0,4% azul de bromofenol, 2% 2-mercaptoetanol). Em seguida, as amostras foram fervidas durante 5 minutos e inseridas diretamente nos poços do gel de poliacrilamida a 12%. Na primeira coluna de cada gel foi inserido 5 µL do padrão (Precision Plus Protein™ All Blue Pre-stained Protein Standards, BioRad, Hercules, Canadá). A corrida de eletroforese foi realizada a uma voltagem constante de 100 V. Após a corrida, os géis foram corados *overnight* com Azul de Coomassie (40% metanol, 10% ácido acético, 2 g Azul de Coomassie). Os géis foram descorados (40% metanol, 10% ácido acético, 50% água destilada) durante 2 horas sob leve agitação e armazenados em água ultrapura até a análise das imagens. As imagens dos géis foram obtidas por densitômetro Bio-Rad ChemiDrop MP (Bio-Rad Inc., Hercules, Estados Unidos), conectado a um computador utilizando o software Image Lab™ 5.2 (Bio-Rad Inc., Hercules, Estados Unidos).

#### **4.6.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) catiônica**

O método de eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) catiônica promove a separação das proteínas de acordo com a carga. Proteínas catiônicas se deslocam do cátodo para o ânodo<sup>29,156</sup>. Esta corrida foi realizada para confirmarmos a ausência das histatinas 1 e 5 no SST. Um total de 20 µg de proteína por amostra (de cada paciente) foi ressuspensa em 20 µL de tampão (4 g de sacarose, 4 mg de verde de metila em um volume final de 10 mL) e como padrão foram utilizados 4 µg de cada histatina (1, 3 e 5). Ambos os géis, de empilhamento e de separação, foram polimerizados por meio de luz incandescente de 100 W durante 9 minutos cada e a corrida de eletroforese foi realizada a uma voltagem constante de 120 V. Os géis foram corados (0,1% azul de Coomassie, 8% metanol, 7% ácido acético) *overnight* com leve agitação. A descoloração foi feita com 40% de metanol, 10% de ácido acético e 50% de água em um volume final de 1 L. Após a aquisição das imagens dos géis (Bio-Rad ChemiDrop MP, Bio-Rad Inc., Hercules, Estados Unidos) as mesmas foram analisadas com o software Image Lab™ 5.2 (Bio-Rad Inc., Hercules, Estados Unidos).

Em seguida aplicou-se o método de Coloração de Prata (Silver Stain, Pierce® Color Silver Stain Kit, Rockford, IL, Estados Unidos) o qual é altamente sensível (<1

ng) e permite a detecção de proteínas em nanogramas. Este método foi utilizado para uma confirmação dupla da ausência das histatinas nas amostras de SST. Primeiramente os géis foram fixados *overnight* (50% etanol, 5% ácido acético) até que parassem de encolher. Após este período, os géis foram lavados com água ultrapura (4x40 minutos) para retornarem ao tamanho original. Em seguida, os géis foram imersos por 30 minutos na *Silver Working Solution* (2 mL reagente de prata, 28 mL de água ultrapura), lavados durante 20 segundos em água ultrapura e incubados na *Reducer Solution* (50% aldeído redutor, 50% base redutora) até que as bandas de interesse se tornassem visíveis. Na sequência, os géis foram lavados novamente em água ultrapura e incubados durante 40 minutos na *Stabilizer Solution* (2 mL base estabilizadora, 88 mL água ultrapura). A aquisição das imagens dos géis e análise das imagens foram realizadas como descrito anteriormente (item 4.6.2).

#### **4.6.4 Digestão *in-solution* das proteínas para espectrometria de massas**

A partir dos resultados obtidos pelo BCA, foram preparados 4 *pools* de SST em microtubos de 2 mL, a fim de representar cada grupo do estudo, sendo: *Pool 1* (grupo NSsDP), *Pool 2* (grupo NScDP), *Pool 3* (grupo SDsDP) e *Pool 4* (grupo SDcDP). Para isso foram pipetados 20 µg de proteína de cada indivíduo de cada grupo, os volumes foram homogeneizados e em seguida liofilizados em um evaporador rotatório (Vacufuge™ Eppendorf AG, Barkhausenweg, Hamburgo, Alemanha). Em seguida, cada *pool* foi ressuspendido em 50 µL da solução 1 (4 M de uréia, 10mM DTT – ditioneitol, 50 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, pH 7,8) e incubado a temperatura ambiente por 1 hora. A digestão foi realizada adicionando-se 150 µL da solução 2 (50 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, pH 7,8) e 2% em peso de tripsina (Promega, Madison, WI, Estados Unidos) por um período de 16 horas em banho-maria a 37°C. Ao término da digestão, as amostras foram purificadas e dessalinizadas (ZipTip C-18 Pipette Tips, EMD Millipore Inc., Alemanha), liofilizadas e submetidas a análise por Cromatografia Líquida por ionização *electrospray* Tandem Espectrometria de Massas (LC-ESI-MS/MS).

#### **4.6.5 Cromatografia líquida por ionização *electro spray* tandem espectrometria de massas (LC-ESI-MS/MS)**

Para esta análise foi utilizado o nano-HPLC Proxeon (Thermo Scientific, Sao Jose, CA, Estados Unidos), que permite cromatografia líquida in-line com a coluna

capilar de 75 mm x 610 cm (Pico Tip<sup>TM</sup> EMITTER, New Objective, Woburn, MA, Estados Unidos) preenchida com resina C18 com poros de 5 µm de diâmetro e 200 Å (Michrom BioResources, Auburn, Califórnia, EUA), acoplada ao espectrômetro de massas (LTQ- Velos, Thermo Scientific, Sao Jose, CA, Estados Unidos), usando ionização por *electrospray* em modo de busca, na faixa de valores m/z 390-2000 em tandem MS/MS. As amostras já secas foram ressuspendidas em 20 µL de ácido fórmico 1% e submetidas a nLC-ESI-MS/MS. O HPLC de fase reversa *nanoflow* foi desenvolvido com um gradiente linear de 85 minutos variando de 0 a 100% de solvente B (ácido fórmico 0,1% em acetonitrila), num fluxo de 200 nL/min, com pressão máxima de 280 bar. Cada espectro (MS) obtido foi seguido por seleção sequencial automatizada de sete peptídeos para CID (*collision-induced dissociation*), com exclusão dinâmica dos íons previamente selecionados.

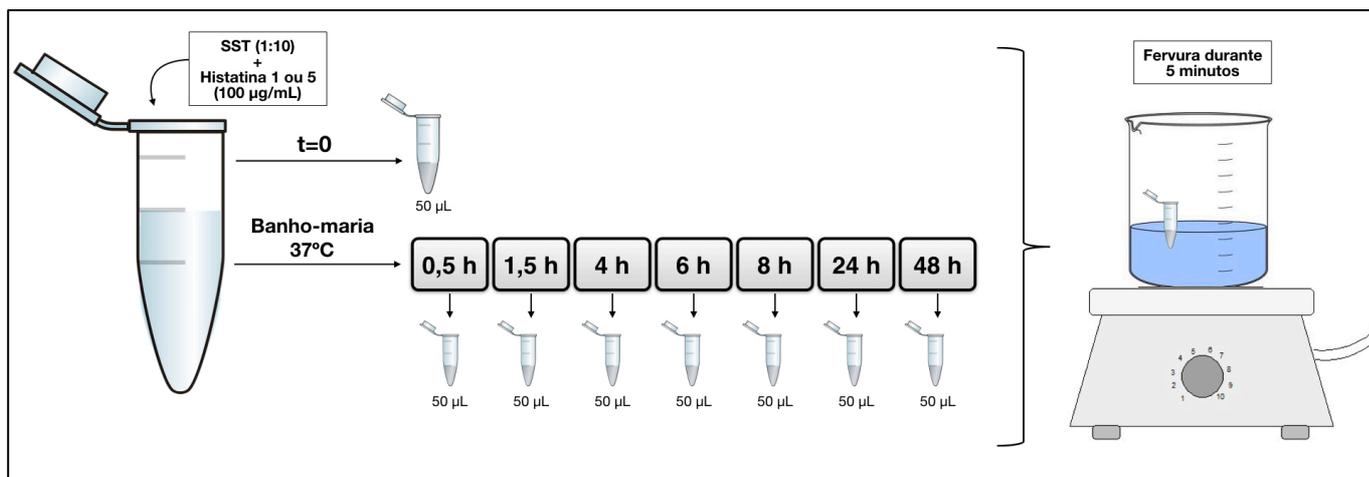
Foram obtidas as listas das proteínas presentes em cada grupo e confeccionado o diagrama de Venn(Venny 2.1)<sup>157</sup>. As proteínas em comum aos quatro grupos, bem como, as intersecções de interesse foram selecionadas e as principais funções retiradas do banco de dados UniProt<sup>158</sup>.

#### **4.6.6 Ensaio de degradação das histatinas 1 e 5 em SST**

Para avaliar a taxa de degradação da histatina 1 e da histatina 5 na saliva total, os experimentos foram conduzidos em amostras individuais de SST diluído (1:10) (n=24), sendo 6 NSsDP (controle), 6 NScDP, 6 SDsDP e 6 SDcDP.

Histatina 1 ou histatina 5 sintéticas (American Peptide Company, Sunnyvale, CA, Estados Unidos) foram adicionadas às amostras de SST (1:10) em uma concentração final de 100 µg/mL e foram incubadas à 37°C em banho-maria por diferentes períodos de tempo (t): 0, 0,5, 1,5, 4, 6, 8, 24 e 48 horas. Imediatamente após a adição das proteínas (t=0) e dos diferentes períodos de incubação uma alíquota de 50 µL de cada amostra foi removida e passou por processo de fervura durante 5 minutos a fim de inibir qualquer atividade proteolítica (Figura 2).

**Figura 2** – Esquema representativo do ensaio de degradação das histatinas 1 e 5.



Fonte: Autoria própria.

O mesmo protocolo de ensaio de degradação das histatinas, foi realizado utilizando-se água ultrapura + histatina 1 ou 5 (controle positivo). As alíquotas foram liofilizadas (Vacufuge™ Eppendorf AG, Barkhausenweg, Hamburgo, Alemanha) e posteriormente, ressuspensas para a realização da eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) catiônica.

#### 4.6.7 Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) catiônica após ensaio de degradação

A eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) catiônica foi executada como descrito anteriormente (item 4.6.3). As alíquotas foram ressuspensas em 20 µL de tampão (4 g de sacarose, 4 mg de verde de metila em um volume final de 10 mL) e inseridas nos poços do gel. O primeiro poço recebeu o padrão (4 µg de cada histatina - 1, 3 e 5) e os poços subsequentes receberam as amostras correspondentes a cada período de incubação (t=0 até t=48 h). A corrida de eletroforese foi realizada a uma voltagem constante de 120 V e os protocolos de coloração e descoloração dos géis foram os mesmos já descritos. As imagens dos géis foram obtidas por densiômetro (Bio-Rad ChemiDrop MP, Bio-Rad Inc., Hercules, Estados Unidos) e analisadas com o software Image Lab™ 5.2 (Bio-Rad Inc., Hercules, Estados Unidos).

A partir das análises das imagens dos géis obtidos, foi realizada a mensuração da densidade das bandas (%) durante o processo de degradação

destas proteínas. A banda referente ao  $t=0$  (imediatamente após a adição da histatina 1 ou 5) teve o seu valor de intensidade considerado 100%. As outras bandas, referentes aos demais períodos de incubação, tiveram a densidade calculada com base na primeira banda de referência ( $t=0$ ).

#### 4.7 Análise Estatística

As características demográficas e os dados clínicos não apresentaram distribuição normal (Shapiro-Wilk;  $p \leq 0,05$ ) e homocedasticidade (Levene;  $p \leq 0,05$ ), portanto, foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, complementado pelo pós teste de Dunn para comparação dos grupos dois a dois. Com relação a quantificação dos micro-organismos na saliva, todos os grupos apresentaram distribuição normal dos dados para *Pg* (Shapiro-Wilk;  $p \geq 0,105$ ), entretanto, o mesmo comportamento não foi observado para *Aa* (Shapiro-Wilk;  $p \leq 0,046$ ). Assim, optou-se pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis para ambos os micro-organismos. Os dados de proteína total apresentaram distribuição normal (Shapiro-Wilk;  $p \geq 0,191$ ) e homogeneidade de variâncias (Levene;  $p = 0,697$ ), sendo aplicado o teste ANOVA a um fator e o pós teste de Tukey para comparações múltiplas.

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

A significância da influência da presença da SD e da DP sobre a degradação das histatinas nos diferentes períodos de análise foi avaliada pelo teste ANOVA de medidas repetidas mista. Tanto para histatina 1 como para histatina 5, a maioria dos dados mostraram distribuição normal (Shapiro-Wilk;  $p \geq 0,075$  e  $p \geq 0,181$ , respectivamente), portanto, considerou-se uma tendência a normalidade. Entretanto, como o pressuposto de esfericidade da matriz de variâncias-covariâncias não foi alcançado (Mauchly;  $p \leq 0,0001$ ), foi aplicada a correção pelo fator Épsilon de Greenhouse-Geisser. Para identificar os pares de médias que diferiam entre si, nos

momentos avaliados, procedeu-se à comparação múltipla de médias com correção de Bonferroni.

As análises de dados foram realizadas com o software (PASW Statistics, v.22, SPSS Inc, Chicago, IL, Estados Unidos), considerando um nível de significância de 0,05.

## 5 RESULTADO

Um total de 40 indivíduos foram examinados, sendo 21 não-sindrômicos e 19 com SD. Entre os não-sindrômicos, 9 não se enquadraram nos critérios de inclusão (2 devido à idade avançada, 2 por fazerem uso de medicamentos, 2 que foram diagnosticados com periodontite agressiva, 2 fumantes e 1 que apresentou menos de 15 dentes na cavidade bucal). No grupo SD, 2 indivíduos não colaboraram durante o exame clínico e coleta de saliva e 5 não se enquadraram nos critérios de inclusão do estudo (3 devido ao uso de medicamentos e 2 que apresentaram quantidade de saliva insuficiente). Assim, os 24 indivíduos selecionados foram alocados em 4 grupos distintos de acordo com a presença ou ausência da DP e com a sua condição genética, sendo: 6 NSsDP, 6 NScDP, 6 SDsDP e 6 SDcDP.

### 5.1 Características Demográficas, Dados Clínicos e Parâmetros Periodontais

O grupo NSsDP (controle) foi composto por 4 indivíduos do gênero masculino e 2 do gênero feminino, enquanto que os demais grupos foram constituídos por 3 indivíduos do gênero masculino e 3 do gênero feminino, não sendo observada diferença estatística significativa com relação ao gênero entre os grupos (teste exato de Fisher;  $p=1,000$ ). Em todos os grupos, os indivíduos apresentaram entre 15 e 28 dentes na cavidade bucal, porém no grupo NSsDP (controle), o número de dentes foi superior quando comparado aos demais grupos (Kruskal-Wallis;  $p=0,004$  e Dunn;  $p\leq 0,019$ ). A análise estatística apontou diferenças para idade ( $p=0,046$ ), com o grupo NScDP apresentando mediana de 44 anos de idade (min:24 e max: 54 anos) que foi significativamente maior que a dos grupos SDsDP (31 anos; min: 26 e max: 37 anos) e SDcDP (31 anos; min: 21 e max: 45 anos), os quais não diferiram entre si. Também não houve diferença significativa entre o grupo NSsDP (controle) (36 anos; min: 33 e max: 48 anos) e os demais grupos.

Os dados clínicos e parâmetros periodontais podem ser observados em detalhes na Tabela 1. Com relação ao fluxo salivar, este foi significativamente menor nos indivíduos com SD comparado aos indivíduos não-sindrômicos ( $p=0,001$ ). Não foi observada diferença estatística para os valores de índice CPO-D entre os grupos deste estudo ( $p=0,158$ ). O teste de Kruskal-Wallis ainda, mostrou diferenças significativas entre os grupos para todos os parâmetros periodontais avaliados ( $p\leq 0,003$ ). Com relação ao IPV (%), valores significativamente mais elevados foram

observados no grupo SDsDP comparado ao grupo NSsDP (controle) (Dunn;  $p=0,008$ ). Os grupos SDcDP e NScDP foram semelhantes entre si (Dunn;  $p=0,694$ ). Entretanto, os indivíduos com SD não apresentaram diferenças significativas nos valores de IPV (%) independentemente da presença da DP (Dunn;  $p=0,935$ ). Também foi observado que o grupo SDsDP apresentou valores semelhante de IPV (%), SM e SS quando comparado ao grupo NScDP (Dunn;  $p=0,776$ ,  $p=0,367$  e  $p=0,220$  respectivamente).

Para os parâmetros PS e NI, pode ser observado na Tabela 1 diferenças estatisticamente significantes na comparação entre os grupos sem DPe com DP (Dunn;  $p\leq 0,037$  e  $p\leq 0,030$  respectivamente), sendo verificada uma maior porcentagem de sítios com  $PS\geq 4\text{mm}$  na presença da DP para indivíduos NS (Dunn;  $p\leq 0,0001$ ) e para indivíduos com SD (Dunn;  $p\leq 0,042$ ). Com relação ao  $NI\geq 3\text{mm}$  (% sítios), esta variável apresentou valores significativamente mais elevados no grupo NScDP em comparação aos grupos NSsDP (Dunn;  $p\leq 0,0001$ ) e SDsDP (Dunn;  $p\leq 0,002$ ). Porém, não houve diferença nas comparações SDcDP e SDsDP (Dunn;  $p\leq 0,063$ ) e entre SDsDP e NSsDP (Dunn;  $p\leq 0,391$ ).

**Tabela 1** – Dados clínicos e parâmetros periodontais avaliados nos grupos estudados (média;±desvio-padrão) e (mediana; mín-máx).

Variáveis	Grupos								Valor de p*
	Não-sindrômico				Síndrome de Down				
	Sem DP (n=6)		Com DP (n=6)		Sem DP (n=6)		Com DP (n=6)		
	Média (±dp)	Mediana (mín-máx)	Média (±dp)	Mediana (mín-máx)	Média (±dp)	Mediana (mín-máx)	Média (±dp)	Mediana (mín-máx)	
<b>Fluxo Salivar (ml/min)</b>	1,43 (±0,50)	1,42 (0,83-2,00) <sup>b</sup>	0,84 (±0,51)	0,72 (0,35-1,62) <sup>b</sup>	0,22 (±0,08)	0,24 (0,11-0,33) <sup>a</sup>	0,24 (±0,21)	0,15 (0,10-0,64) <sup>a</sup>	0,001
<b>Índice CPO-D</b>	5,67 (±1,51)	6,00 (4,00-8,00) <sup>a</sup>	7,17 (±3,54)	7,00 (2,00-11,00) <sup>a</sup>	6,50 (±2,26)	6,50 (3,00-10,00) <sup>a</sup>	4,67 (±7,12)	2,50 (0,00-19,00) <sup>a</sup>	0,158
<b>IPV (% faces)</b>	6,25 (±2,26)	6,70 (3,57-8,92) <sup>a</sup>	48,04 (±13,01)	48,44 (27,88-68,00) <sup>b</sup>	38,16 (±18,84)	32,67 (21,15-70,65) <sup>b</sup>	44,79 (±31,10)	35,71 (16,96-100,00) <sup>b</sup>	0,003
<b>SM (% faces)</b>	0,30 (±0,73)	0,00 (0,00-1,78) <sup>a</sup>	19,49 (±13,23)	21,52 (4,16-32,00) <sup>b</sup>	9,41 (±5,56)	9,06 (3,00-16,30) <sup>b</sup>	28,45 (±26,72)	18,61 (8,03-79,34) <sup>b</sup>	0,002
<b>SS (% sítios)</b>	0,89 (±1,91)	0,00 (0,00-4,76) <sup>a</sup>	31,81 (±12,79)	29,82 (17,31-48,55) <sup>b</sup>	19,93 (±12,00)	19,21 (1,28-34,78) <sup>b</sup>	34,08 (±18,07)	33,31 (13,58-66,67) <sup>b</sup>	0,002
<b>PS (mm)</b>	1,67 (±0,22)	1,62 (1,39-2,04) <sup>a</sup>	2,97 (±0,43)	2,91 (2,51-3,57) <sup>b</sup>	1,86 (±0,24)	1,90 (1,53-2,17) <sup>a</sup>	2,55 (±0,37)	2,50 (2,09-3,14) <sup>b</sup>	0,0001
<b>PS ≥ 4mm (% sítios)</b>	0,00 (±0,00)	0,00 (0,00-0,00) <sup>a</sup>	26,17 (±13,08)	23,00 (11,00-42,00) <sup>b</sup>	2,00 (±1,67)	2,50 (0,00-4,00) <sup>a</sup>	13,67 (±7,31)	11,00 (7,00-25,00) <sup>b</sup>	0,0001
<b>NI (mm)</b>	1,67 (±0,22)	1,62 (1,39-2,05) <sup>a</sup>	3,43 (±0,70)	3,28 (2,78-4,49) <sup>b</sup>	1,81 (±0,20)	1,82 (1,49-2,05) <sup>a</sup>	2,69 (±0,54)	2,45 (2,22-3,51) <sup>b</sup>	0,0001
<b>NI ≥ 3mm (% sítios)</b>	9,67 (±9,97)	5,50 (2,00-28,00) <sup>a</sup>	67,83 (±14,32)	67,00 (51,00-86,00) <sup>c</sup>	17,33 (±5,35)	20,00 (7,00-21,00) <sup>ab</sup>	42,83 (±9,91)	43,50 (29,00-56,00) <sup>bc</sup>	0,0001

dp=desvio-padrão; DP=Doença Periodontal; IPV=Índice de Placa Visível; SM=Sangramento Marginal; SS=Sangramento à Sondagem; PS=Profundidade de Sondagem; NI=Nível de Inserção. \*Teste de Kruskal-Wallis. Letras diferentes indicam a presença de diferença estatisticamente significativa entre os grupos. (pós-teste de Dunn; p≤0,037).

Fonte: Autoria própria.

## 5.2 Quantificação Absoluta de Periodontopatógenos por PCR em Tempo Real (qPCR)

Os resultados referentes à Quantificação Absoluta por PCR em Tempo Real (qPCR) de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa) e *Porphyromonas gingivalis* (Pg) estão apresentados na Tabela 2.

Foi verificada ausência de diferença estatística na contagem de cópias do gene 16rRNA entre os grupos estudados para o micro-organismo Aa (Kruskal-Wallis;  $p=0,803$ ). Por outro lado, uma quantidade significativamente aumentada de cópias do gene 16rRNA para o patógeno Pg foi verificada no grupo NScDP em comparação aos grupos NS e SD sem DP (Dunn;  $p=0,003$  e  $p=0,037$  respectivamente). Ainda, verificou-se ausência de diferença estatística significativa na quantificação de Pg entre os grupos SDcDP e SDsDP (Dunn;  $p=0,624$ ), SDcDP e NScDP (Dunn;  $p=0,111$ ) e entre os grupos SDsDP e NSsDP (Dunn;  $p=0,348$ ).

**Tabela 2** - Cópias do gene 16SrRNA de micro-organismos periodontopatogênicos (média; $\pm$ desvio-padrão) e (mediana; mín-máx) em amostras de saliva de acordo com o grupo.

Micro-organismo	Log 1 + número de cópias do gene 16SrRNA								Valor de p*
	Não-Sindômico				Síndrome de Down				
	Sem DP (n=6)		Com DP (n=6)		Sem DP (n=6)		Com DP (n=6)		
Média ( $\pm$ dp)	Mediana (mín-máx)	Média ( $\pm$ dp)	Mediana (mín-máx)	Média ( $\pm$ dp)	Mediana (mín-máx)	Média ( $\pm$ dp)	Mediana (mín-máx)		
Aa	1,75 ( $\pm 1,09$ )	2,08 (0,43-2,75) <sup>a</sup>	1,97 ( $\pm 0,86$ )	2,34 (0,29-2,50) <sup>a</sup>	1,41 ( $\pm 1,27$ )	1,40 (0,15-2,75) <sup>a</sup>	2,03 ( $\pm 0,99$ )	2,42 (0,14-2,81) <sup>a</sup>	0,803
Pg	1,04 ( $\pm 0,35$ )	1,14 (0,42-1,34) <sup>a</sup>	4,57 ( $\pm 1,84$ )	5,23 (1,14-6,20) <sup>b</sup>	1,53 ( $\pm 0,63$ )	1,52 (0,77-2,18) <sup>a</sup>	1,99 ( $\pm 1,57$ )	1,65 (0,33-4,95) <sup>ab</sup>	0,022

dp=desvio-padrão; DP=Doença periodontal. \*Teste de Kruskal-Wallis. Letras diferentes indicam a presença de diferença estatisticamente significativa entre os grupos. (pós-teste de Dunn;  $p \leq 0,037$ ).

Fonte: Autoria própria.

## 5.3 Proteína Total e Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (PAGE) em Presença de Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) e Catiônica

Os resultados referentes a concentração de proteína total (mg/mL) nas amostras de SST podem ser observados na Tabela 3. O grupo SDcDP apresentou maior concentração de proteína total estatisticamente

significante comparado aos outros grupos (Tukey;  $p \leq 0,003$ ), os quais não diferiram entre si (Tukey;  $p \geq 0,479$ ).

**Tabela 3** – Concentração de proteína total (mg/mL) em amostras de saliva de acordo com o grupo (média;  $\pm$ desvio-padrão) e (mediana; mín-máx).

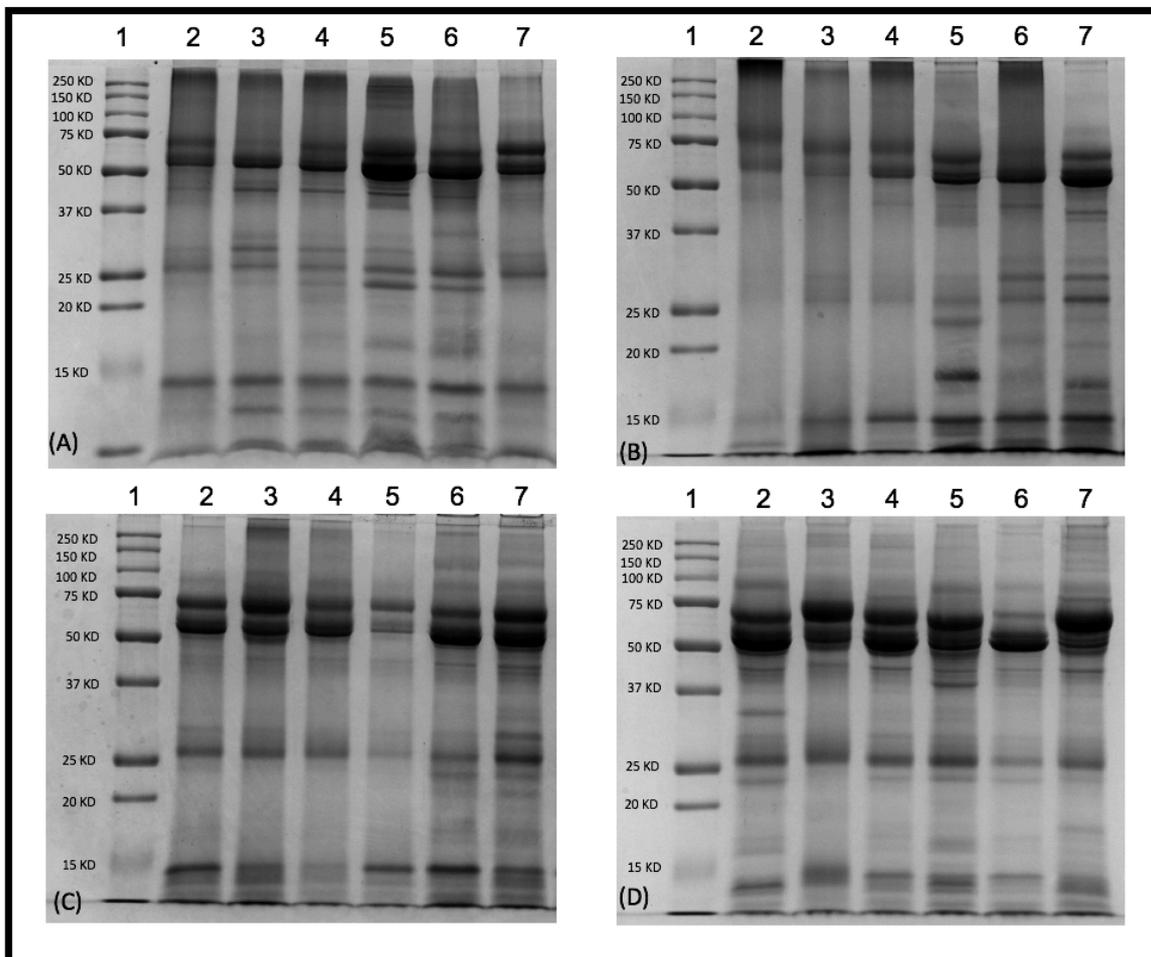
Grupos		Concentração de Proteína Total (mg/mL)		Valor de p*
		Média ( $\pm$ dp)	Mediana (mín-máx)	
Não Síndromico	sem DP	1,05 ( $\pm$ 0,27) <sup>a</sup>	1,13 (0,70-1,42)	$\leq 0,0001$
	com DP	1,17 ( $\pm$ 0,37) <sup>a</sup>	1,31 (0,50-1,50)	
Síndrome de Down	sem DP	1,37 ( $\pm$ 0,45) <sup>a</sup>	1,45 (0,80-2,00)	
	com DP	2,26 ( $\pm$ 0,41) <sup>b</sup>	2,38 (1,59-2,68)	

dp=desvio-padrão; DP=Doença Periodontal. \*ANOVA a um fator. Letras diferentes indicam a presença de diferença estatisticamente significativa entre os grupos. (pós-teste de Tukey;  $p \leq 0,003$ ).

Fonte: Autoria própria.

A corrida inicial de Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE) promoveu a separação das proteínas de acordo com o seu peso molecular permitindo a visualização do padrão proteico em cada amostra de SST (Figura 3). É possível observar que todas as amostras apresentaram padrões proteicos semelhantes entre os indivíduos do mesmo grupo, entretanto, pela densidade das bandas, nota-se que houve pequena divergência com relação a abundância das proteínas entre os grupos. Esta análise foi confirmada pelos resultados de concentração de proteína total apresentados na Tabela 3.

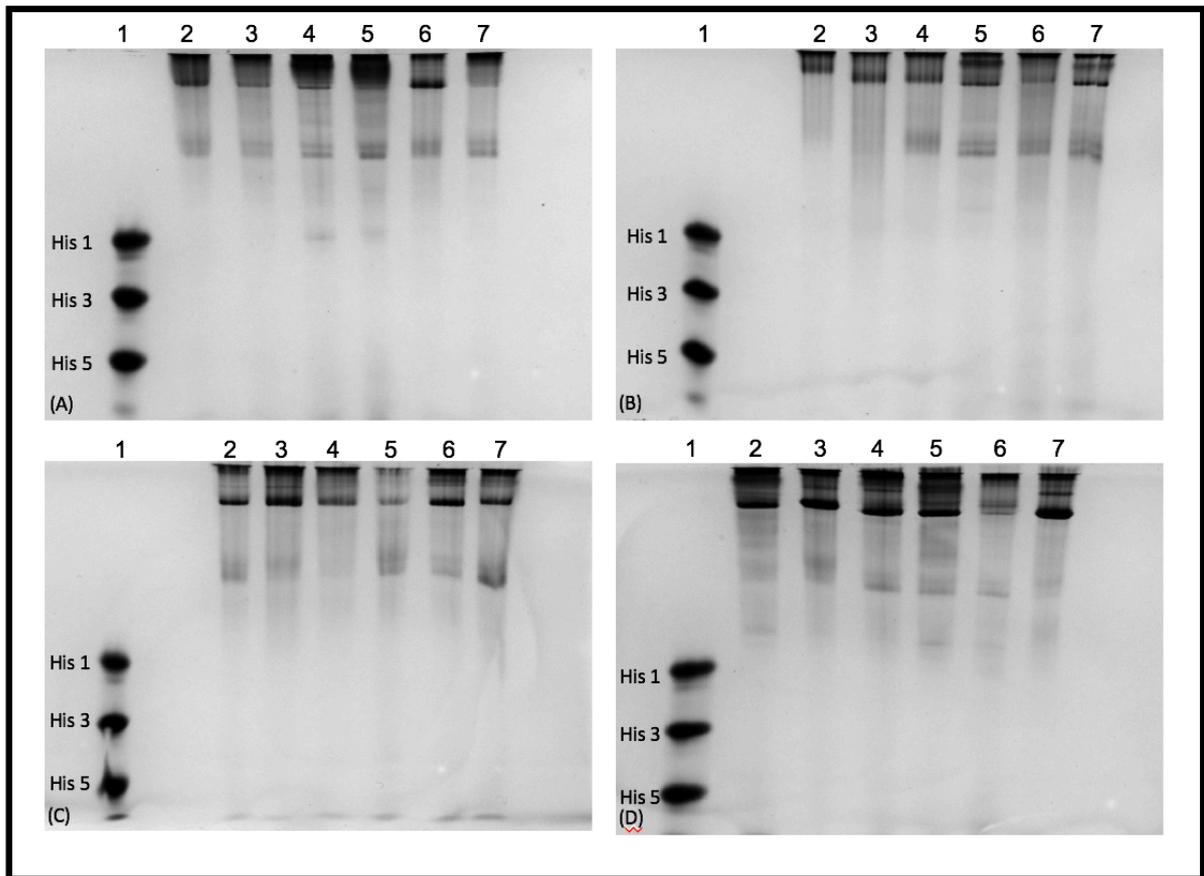
**Figura 3** – Imagens dos géis SDS-PAGE após eletroforese e coloração com Azul de Coomassie.



Cada gel representa um grupo do estudo: (A) Não-sindrômico sem DP (controle); (B) Não-sindrômico com DP; (C) Síndrome de Down sem DP e (D) Síndrome de Down com DP. A coluna da esquerda de cada gel (coluna 1) corresponde as bandas do padrão utilizadas como referência, e as colunas 2 a 7, correspondem as bandas obtidas de acordo com o peso molecular na amostra de SST de cada indivíduo do grupo. Fonte: Autoria própria.

Para confirmar a ausência das histatinas nas amostras de SST foi realizada a Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (PAGE) Catiônica, seguida da coloração com Azul de Coomassie (Figura 4) e Coloração de Prata (Figura 5).

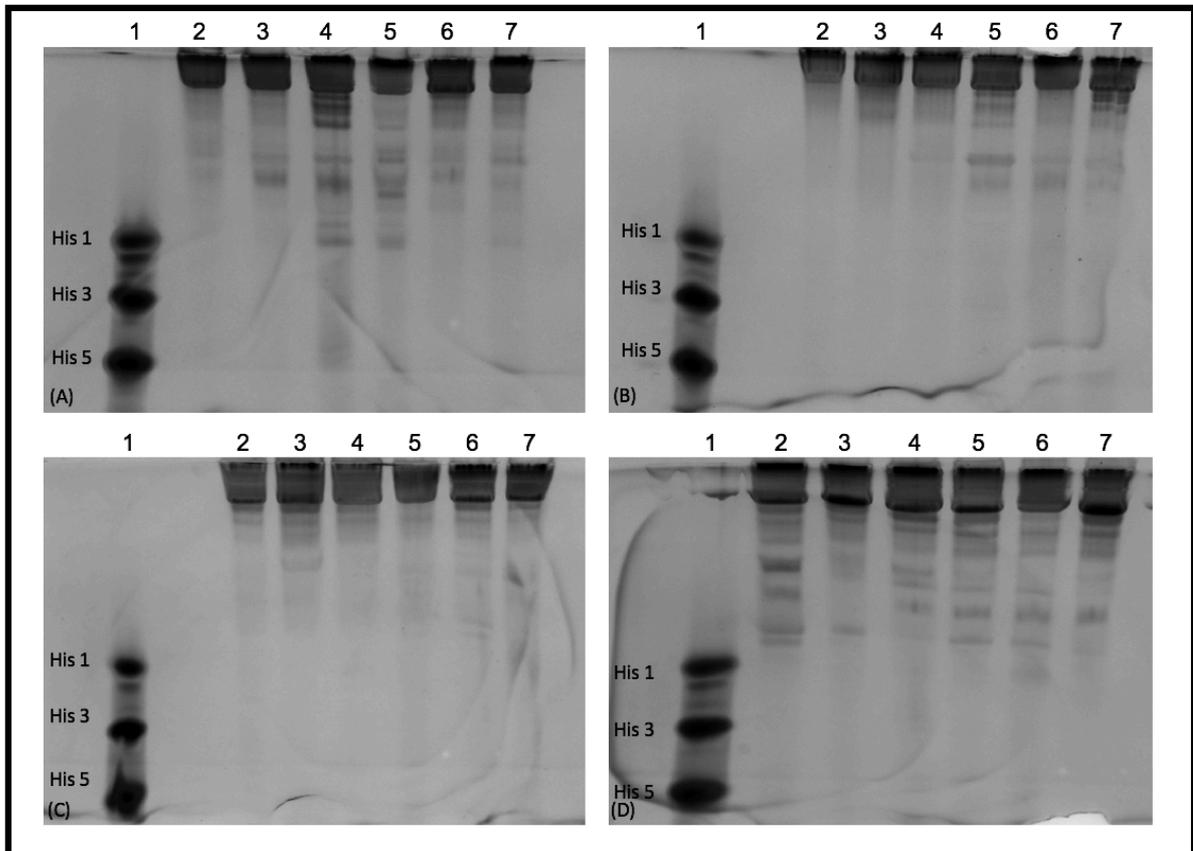
**Figura 4** – Imagens dos géis de Poliacrilamida Catiônica após eletroforese e coloração com Azul de Coomassie.



Cada gel representa um grupo do estudo: (A) Não-sindrômico sem DP (controle); (B) Não-sindrômico com DP; (C) Síndrome de Down sem DP e (D) Síndrome de Down com DP. A coluna da esquerda de cada gel (coluna 1) corresponde as bandas do padrão de histatina e as colunas 2 a 7, correspondem as bandas das amostras de SST de cada indivíduo do grupo.

Fonte: Autoria própria.

**Figura 5** – Imagens dos géis de Poliacrilamida Catiônica após eletroforese e coloração de prata.



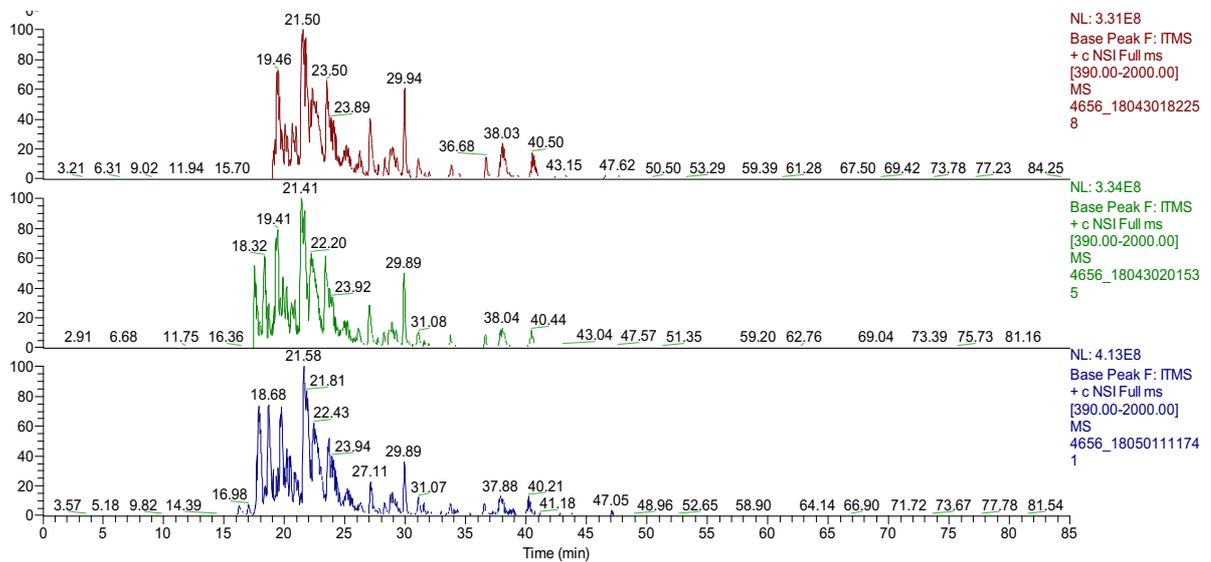
Cada gel representa um grupo do estudo: (A) Não-sindrômico sem DP (controle); (B) Não-sindrômico com DP; (C) Síndrome de Down sem DP e (D) Síndrome de Down com DP. A coluna da esquerda de cada gel (coluna 1) corresponde as bandas do padrão de histatina e as colunas 2 a 7, correspondem as bandas das amostras de SST de cada indivíduo do grupo.

Fonte: Autoria própria.

#### 5.4 Identificação das Proteínas - Digestão *in-solution*

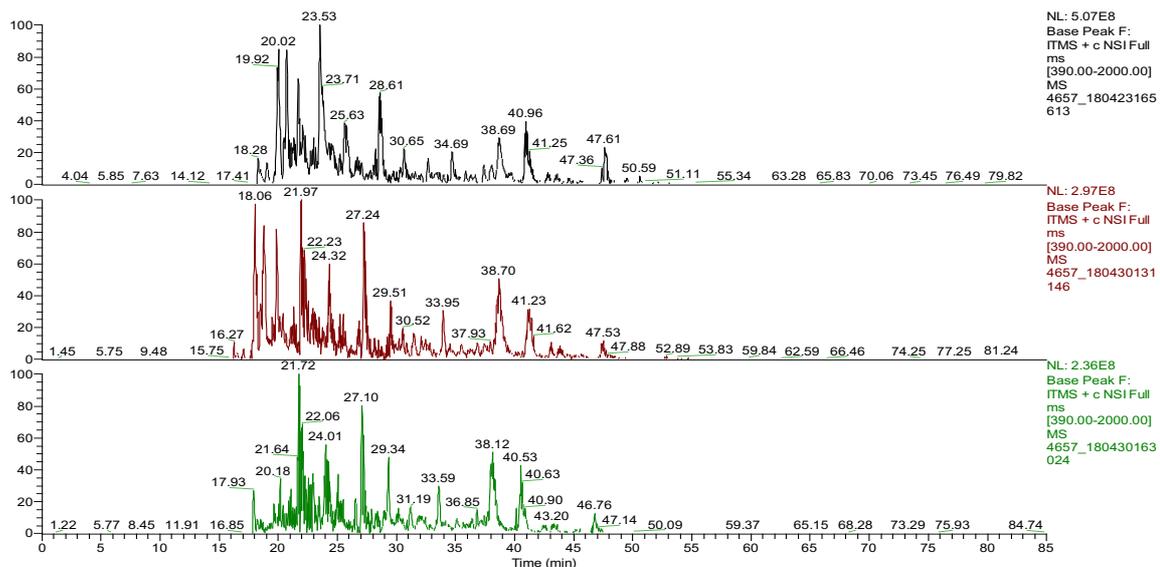
A identificação das proteínas foi realizada em triplicata por LC-ESI-MS/MS, usando para cada grupo NSsDP, NScDP, SDsDP e SDcDP, o *pool* das amostras de saliva contendo 20 µg de proteína de cada indivíduo. O cromatograma base-pico da cromatografia de fase reversa monitorada pelo espectrômetro de massas representa a intensidade de todos os íons de peptídeos da amostra em uma única corrida. As triplicatas dos cromatogramas correspondentes a *pool* de cada grupo estão apresentadas nas Figuras 6 a 9. Pode ser observado que existe uma eluição consistente das proteínas/peptídeos entre 10 e 60 minutos.

**Figura 6** – Cromatogramas do *pool* de saliva do grupo não-sindrômico sem doença periodontal. A separação de peptídeos foi sucedida utilizando coluna de cromatografia líquida de fase reversa com nano fluxo, e gradiente de eluição variando de 0 a 100% de solvente B (ácido fórmico 0,1% em acetonitrila) em 85 minutos.



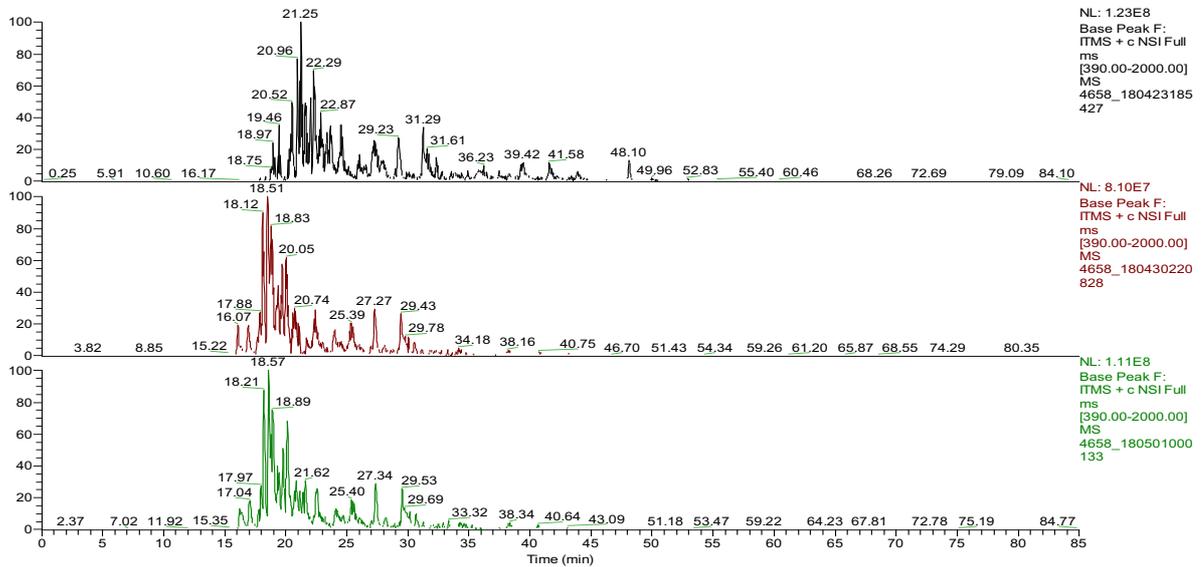
Fonte: Elaboração própria.

**Figura 7** – Cromatogramas do *pool* de saliva do grupo não-sindrômico com doença periodontal; A separação de peptídeos foi sucedida utilizando coluna de cromatografia líquida de fase reversa com nano fluxo, e gradiente de eluição variando de 0 a 100% de solvente B (ácido fórmico 0,1% em acetonitrila) em 85 minutos.



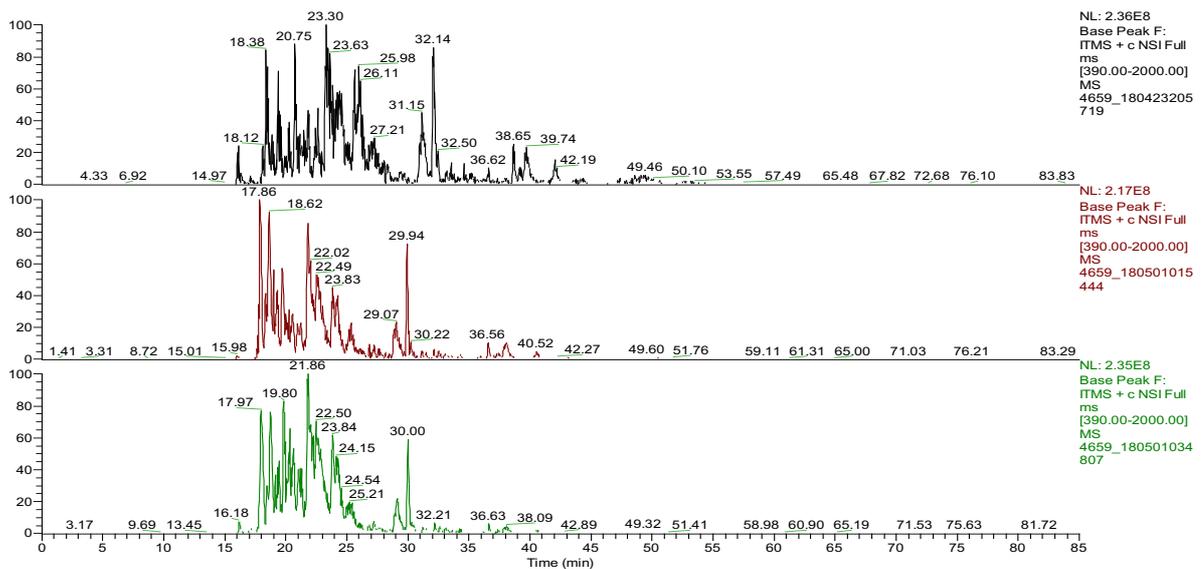
Fonte: Elaboração própria.

**Figura 8** – Cromatogramas do *pool* de saliva do grupo síndrome de Down sem doença periodontal. A separação de peptídeos foi sucedida utilizando coluna de cromatografia líquida de fase reversa com nano fluxo, e gradiente de eluição variando de 0 a 100% de solvente B (ácido fórmico 0,1% em acetonitrila) em 85 minutos.



Fonte: Elaboração própria.

**Figura 9** – Cromatogramas do *pool* de saliva do grupo síndrome de Down com doença periodontal. A separação de peptídeos foi sucedida utilizando coluna de cromatografia líquida de fase reversa com nano fluxo, e gradiente de eluição variando de 0 a 100% de solvente B (ácido fórmico 0,1% em acetonitrila) em 85 minutos.

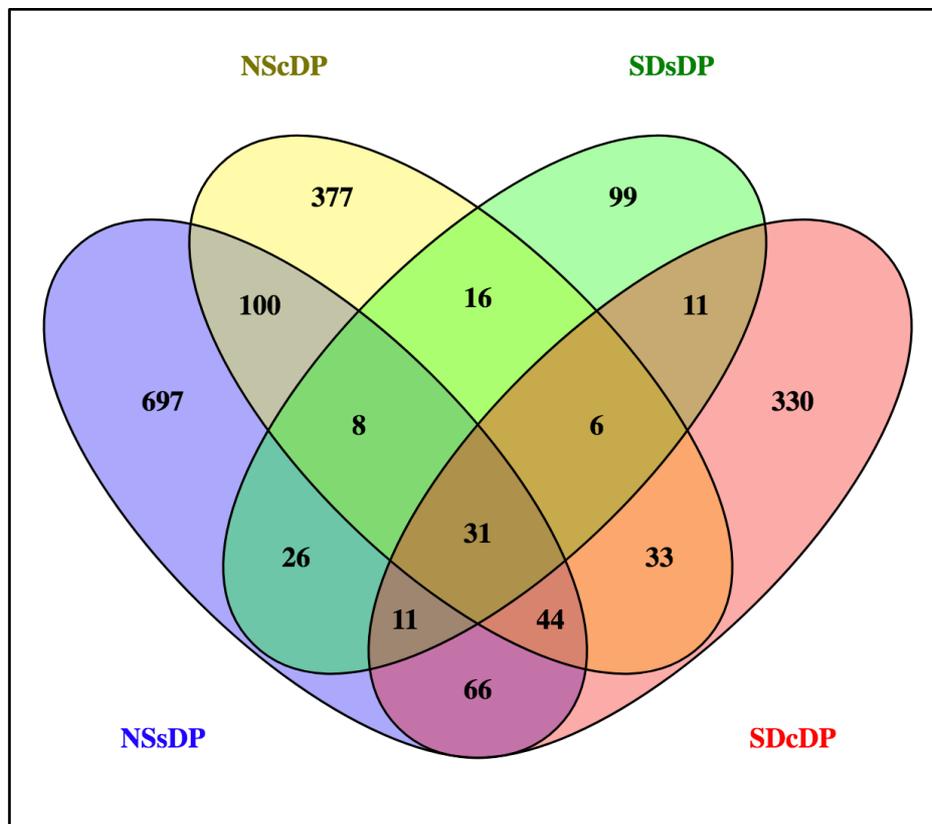


Fonte: Elaboração própria.

Foram identificadas um total de 1855 proteínas nos *pools* das amostras de saliva dos 4 grupos. Destas, 697 foram exclusivas para o grupo NSsDP, enquanto que os grupos NScDP, SDsDP e SDcDP apresentaram 377, 99 e 330 proteínas exclusivas, respectivamente (Figura 10). Além disso, 31 proteínas foram identificadas em comum aos quatro grupos (Figura 10 e Tabela 4).

Entre as diversas proteínas identificadas, destacam-se especialmente àquelas encontradas em comum nos grupos SD e NS com doença periodontal (33 proteínas), bem como, as 11 proteínas em comum para os grupos de indivíduos com SD. Desta maneira, estas proteínas tiveram sua função estudada já que podem estar potencialmente relacionadas com a DP e a SD, respectivamente (Tabelas 5 e 6). As listas completas com as proteínas exclusivas identificadas em cada grupo estão disponíveis nos APÊNDICES C, D, E e F.

**Figura 10** – Diagrama de Venn mostrando a relação do número de proteínas identificadas em amostras de *pool* de saliva dos grupos estudados e suas inter-relações.



NSsDP=Não-sindrômico sem doença periodontal (controle);  
NScDP=Não-sindrômico com doença periodontal; SDsDP=Síndrome de Down sem doença periodontal e SDcDP=Síndrome de Down com doença periodontal.

Fonte: Autoria própria.

**Tabela 4** - Proteínas salivares identificadas por espectrometria de massas na abordagem de digestão *in-solution* em comum nos pools de saliva de todos os grupos.

Número de Acesso	Nome da Proteína	Principal Função Molecular/Biológica*	Razão de Abundância		
			NScDP/NSsDP	SDsDP/NSsDP	SDcDP/NSsDP
P04745	$\alpha$ -amilase	Metabolismo	0,51	0,29	0,24
Q8WXI7	Mucina-16	Lubrificação e Proteção	0,98	0,35	0,75
P02814	Proteína 3b andrógeno-regulada da glândula submaxilar	Componente Celular	0,91	0,45	0,59
Q8WZ42	Titina	Adesão	1,15	1,16	0,97
Q7Z5P9	Mucina-19	Lubrificação e Proteção	1,25	0,30	1,36
P01036	Cistatina-S	Antimicrobiana	0,74	0,42	0,25
Q9HC84	Mucina-5b	Lubrificação e Antimicrobiana	0,50	0,31	0,56
Q03164	Histona-lisina n-metiltransferase 2a	Sinalização Celular	0,88	0,35	0,63
P98088	MUC5ac (fragmento)	Lubrificação e Proteção	0,85	0,43	1,25
Q9Y6V0	Proteína Piccolo	Adesão	1,41	0,14	0,41
Q12955	Anquirina-3	Metabolismo	0,81	0,25	0,19
P23280	Anidrase Carbônica 6	Não especificada	0,46	0,23	0,29
P02751	Fibronectina	Adesão	0,63	0,56	0,59
Q6W4X9	Mucina-6	Lubrificação e Proteção	0,48	0,63	0,52
P12273	Proteína induzida por Prolactina	Interação proteína/proteína	0,75	0,63	0,67

continua

**Tabela 4** - Proteínas salivares identificadas por espectrometria de massas na abordagem de digestão *in-solution* em comum nos pools de saliva de todos os grupos.

					conclusão
Q86YZ3	Hornerina	Ceratinização	0,18	0,18	1,64
Q96DA0	Homólogo B da proteína 16 de grânulo de zimogénio	Adesão	0,71	0,48	0,67
P01833	Receptor Polimérico de imunoglobulina	Transporte	0,57	0,67	0,86
P04080	Cistatina-B	Antimicrobiana e Metabolismo	0,52	0,86	0,48
Q7Z2U7	Proteína não caracterizada	Não especificada	0,19	0,67	0,62
Q15772	Proteína Quinase preferencialmente espressa pelo músculo estriado	Diferenciação Celular	0,14	0,62	0,29
A8K6L7	cDNA flj78668	Sinalização celular e Adesão	1,29	1,79	0,79
B4DW52	cDNA flj55253	Adesão	1,15	1,54	1,46
Q8IVL0	Neuron navigator 3	Resposta Imune	1,15	0,85	1,08
P01024	Complemento C3	Resposta Imune	0,67	0,50	1,00
Q5D862	Filagrina-2	Componente Celular	1,08	0,42	0,83
P10599	Tiorredoxina	Resposta Imune e Antioxidante	0,27	0,64	0,27
H6VRG3	Ceratina 1	Componente Celular/Estrutural	0,82	1,27	0,91
E5RJ29	Ph and sec7 domain-containing protein 3	Regulação da Transdução	0,57	0,57	0,43
A0A024QZH6	Serine arginine-rich pre-mrna splicing factor sr-a1, isoform cra_a	Não especificada	4,14	3,57	1,14
P06733	$\alpha$ -enolase	Resposta Imune e Transcrição	0,80	1,40	2,20

\*Os dados referentes às principais funções das proteínas foram retirados do banco de dados Uniprot<sup>158</sup>.  
Fonte: A autoria própria.

**Tabela 5** – Proteínas salivares identificadas por espectrometria de massas na abordagem de digestão *in-solution* em comum nos pools de saliva dos grupos NScDP e SDcDP.

<b>Número de Acesso</b>	<b>Nome da Proteína</b>	<b>Principal Função Molecular/Biológica*</b>	<b>Razão de Abundância SDcDP/NScDP</b>
B4E2K8	cDNA FLJ61075	Receptor	0,44
Q9Y4F3	Regulador de Meiose e Fator 1 de estabilidade do mRNA	Adesão e Meiose	0,52
F8WEP2	Fator de ribosilação do ADP - proteína 6- proteína 4	Não especificada	1,35
Q9NXV6	Proteína de interação - CDKN2A	Regulação	1,14
B2RMV2	Proteína CYTSA	Não especificada	1,08
Q99102	Mucina-4 (Fragmento)	Adesão	5,09
A0A0J9YWK3	Proteína cordon-bleu	Adesão	0,82
A0A0A0MSW3	Proteína do complexo poro nuclear Nup214	Não especificada	1,09
Q7L804	Família Rab11 – interação com proteína 2	Não especificada	0,45
A8K8N3	cDNA FLJ78740	Divisão Celular	0,20
Q5SYB0	Domínios FERM e PDZ – contendo proteína 1	Regulação da proteína G	0,20
Q5VWN6	Proteína FAM208B	Não especificada	0,89
Q6WRI0	Imunoglobulina - super família membro 10	Diferenciação Celular	0,89
Q96HA1	Proteína de membrana nuclear envelope POM 121	Transporte	2,50
E7EVA0	Proteína Microtubo-associada	Adesão	2,00

continua

**Tabela 5** – Proteínas salivares identificadas por espectrometria de massas na abordagem de digestão *in-solution* em comum nos pools de saliva dos grupos NScDP e SDcDP.

			conclusão
Q4GLM9	NADH -ubiquinona	oxidoreductase	Transporte
	cadeia 5		0,75
P07737	Profilina-1		Adesão ATP
E9PPI0	Transportador de ânions orgânicos		Transporte
	membro da família do Solute carrier		
	5A1		0,33
B3KXT2	cDNA FLJ45998		Receptor
B4E2A4	cDNA FLJ53275		Não especificada
Q5T1R4	Fator de Transcrição HIVEP3		Regulação da Transcrição
B2R6H6	cDNA, FLJ92954		Heterodimerização proteica
B2R7X4	cDNA, FLJ93646		Receptor
H3BQM0	Non-canonical poly(A) RNA polimerase		Adesão e Divisão Celular
	PAPD5		3,25
Q14517	Protocaderina Fat 1		Adesão Celular
Q8TDJ6	DmX- proteína 2		Regulação Endócrina
Q4W5T8	Proteína não caracterizada Putativa		Adesão celular
	PKP4 (Fragmento)		1,00
Q9BTC0	Obliterator 1 – Indutor de apoptose		Apoptose
Q9UQ26	Regulador da membrana sináptica de		Diferenciação
	excitose - proteína 2		1,33
B4E186	cDNA FLJ56834		Não especificada
B3KU50	cDNA FLJ39199		Adesão RNA
H3BRG5	Proteína 13 transportadora de lipídeo		Transporte
	StAR-related (Fragmento)		5,67
A0A0A0MS66	Fosfatase LPIN1		Catabolismo
			3,00

\*Os dados referentes às principais funções das proteínas foram retirados do banco de dados Uniprot<sup>158</sup>.

Fonte: Autoria própria.

**Tabela 6** - Proteínas salivares identificadas por espectrometria de massas na abordagem de digestão *in-solution* em comum nos pools de saliva dos grupos SDsDP e SDcDP.

<b>Número de Acesso</b>	<b>Nome da Proteína</b>	<b>Principal Função Molecular/Biológica*</b>	<b>Razão de Abundância SDcDP /SDsDP</b>
Q6P0Q8	Proteína quinase 2 – Serina/Treonina microtubo associada	Adesão e Regulação Celular	0,88
A7E2D6	Proteína NAV2	Neurogênese	0,63
B4DSS0	cDNA FLJ59300	Receptor e Adesão RNA	5,17
B9EK39	Proteína TANC1	Não especificada	0,50
Q9UL88	Miosina - região variável de imunoglobulina de cadeia pesada (Fragmento)	Não especificada	1,20
Q59H82	Domínio PR- variante zinco finger proteína 2 (Fragmento)	Adesão	1,60
Q5SXM2	snRNA-proteína ativadora do complexo subunidade 4	Adesão DNA e Transcrição	3,25
Q68DY8	Proteína não caracterizada Putativa DKFZp686I11137	Adesão Celular	1,50
Q96RY5	Proteína cramped-like	Adesão DNA	3,50
P78386	Ceratina, tipo II Hb5	Estrutural	3,50
A8KAB8	cDNA FLJ77595	Adesão	8,50

\*Os dados referentes às principais funções das proteínas foram retirados do banco de dados Uniprot<sup>158</sup>.

Fonte: Autoria própria.

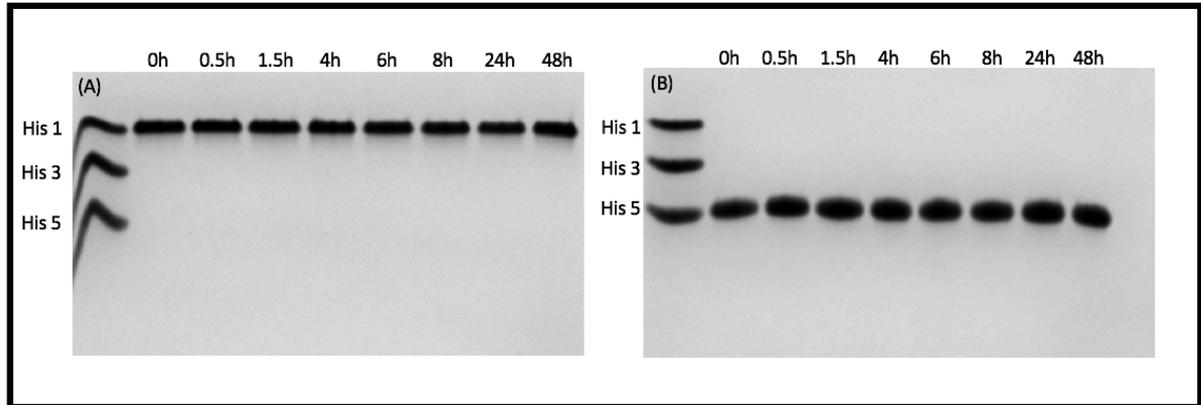
### **5.5 Ensaio de Degradação das Histatinas 1 e 5 em SST e Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (PAGE) Catiônica**

Na Figura 11 estão representados os géis do controle positivo, em que a corrida de eletroforese foi realizada com água ultrapura e proteína, confirmando a ausência do processo de degradação. As Figuras 12 a 15 representam a degradação das histatinas 1 e 5 e os produtos formados, após a eletroforese em gel de Poliacrilamida (PAGE) Catiônica de cada participante do estudo. A mensuração da densidade média das bandas (%) referentes aos indivíduos de cada grupo está apresentada na Tabela 7 e nos Gráficos 1 e 2.

A análise estatística dos dados contidos na Tabela 7, mostrou que a densidade das bandas sofreu influência significativa do período de incubação (Anova;  $p \leq 0,0001$ , poder=1,000). Além disso, foi constatado que o processo de degradação mostrou-se mais acentuado na presença da DP com significância estatística (Anova;  $p \leq 0,0001$ , poder=0,964) e que houve uma maior taxa de degradação da histatina 5 quando comparada à histatina 1 (Anova;  $p \leq 0,0001$ , poder=0,959).

Avaliando-se a degradação de cada histatina em SST (1:10) separadamente foi verificada uma maior taxa de degradação para a histatina 1 nos indivíduos com SD em comparação com os não sindrômicos ( $p=0,036$ ) e naqueles que apresentavam DP em comparação com os sem DP ( $p=0,030$ ) (Gráfico 3). No entanto, não houve interação entre esses fatores (SD e DP) ( $p=0,580$ ) e nem com os períodos de incubação ( $p \geq 0,076$ ). Para a histatina 5, a presença da SD não teve efeito significativo sobre o processo de degradação ( $p=0,791$ ). Por outro lado, foi verificada uma maior taxa de degradação na presença da DP do que na ausência da mesma ( $p=0,005$ ). Ainda, foi observada interação significativa entre DP e os períodos de incubação para esta proteína ( $p=0,005$ ) (Gráfico 4).

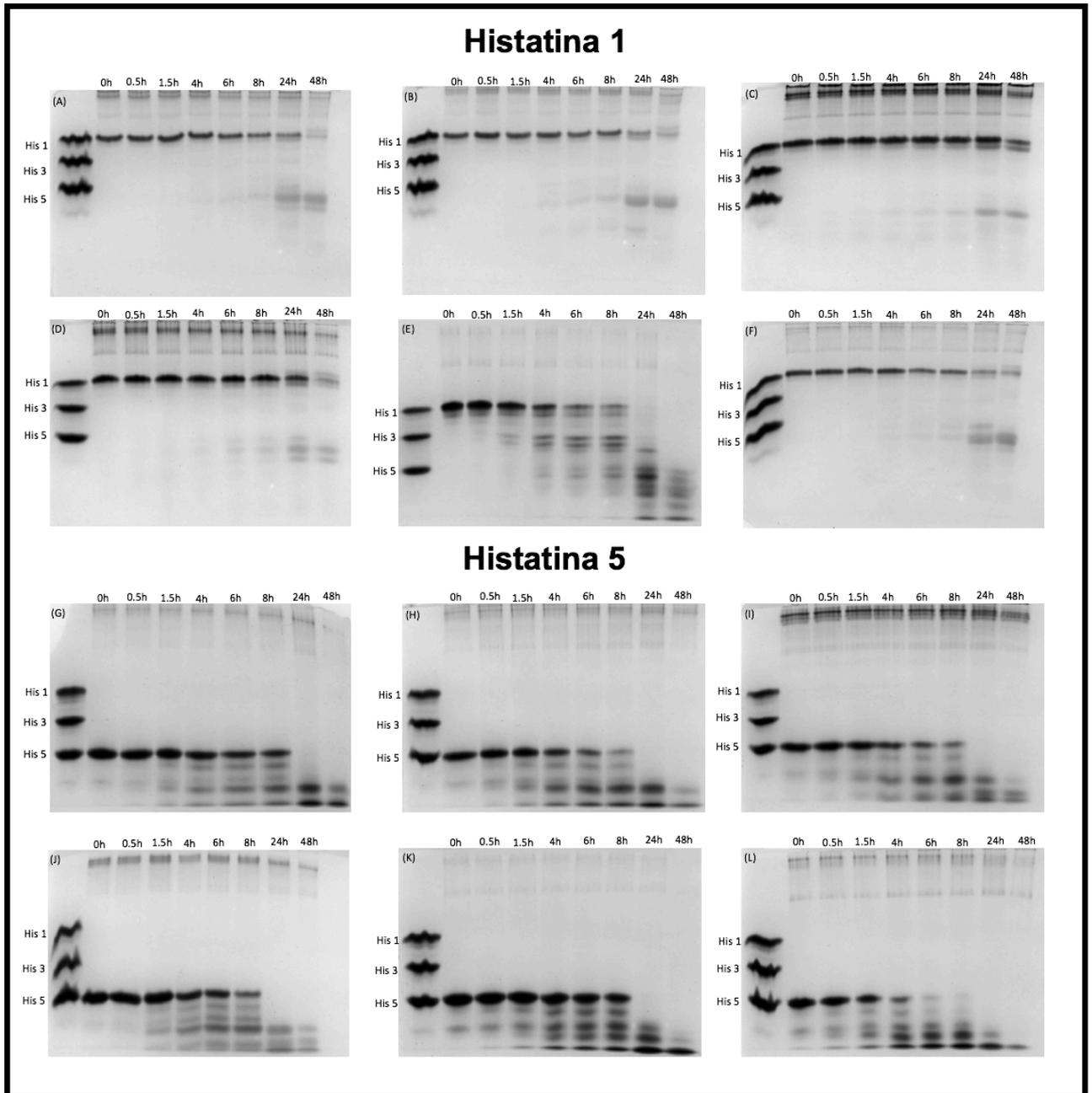
**Figura 11** - Imagens dos géis de Poliacrilamida Catiônica após eletroforese e coloração com Azul de Coomassie. (A) Controle positivo da histatina 1 e (B) Controle positivo da histatina 5.



A coluna da esquerda (coluna 1) corresponde as bandas do padrão de histatina e as colunas 2 a 7 mostram os diferentes períodos de incubação ( $t=0$ ; 0,5; 1,5; 4; 6; 8; 24 e 48 horas).

Fonte: Autoria própria.

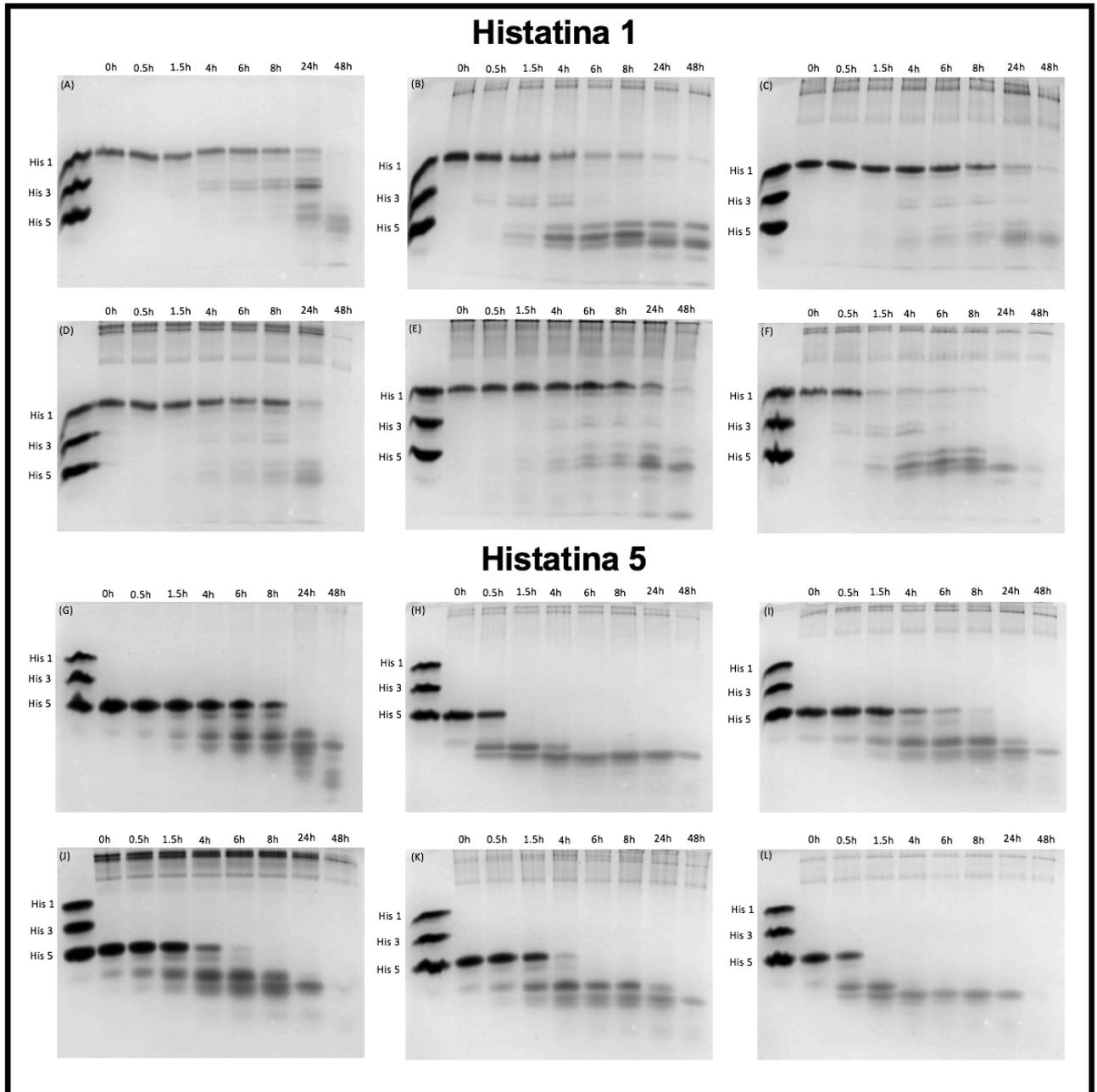
**Figura 12** - Imagens dos géis de Poliacrilamida Catiônica após eletroforese e coloração com Azul de Coomassie referentes ao grupo não-sindrômico sem doença periodontal (controle).



A primeira coluna da esquerda corresponde as bandas do padrão de histatina e as demais colunas mostram o processo de degradação das histatins e a formação dos produtos nos diferentes periodos de incubação (t=0; 0,5; 1,5; 4; 6; 8; 24 e 48 horas). As imagens dos géis de (A) até (F) representam a degradação da histatina 1 e de (G) até (L) representam a degradação da histatina 5 nas amostras individuais de SST (1:10).

Fonte: Autoria própria

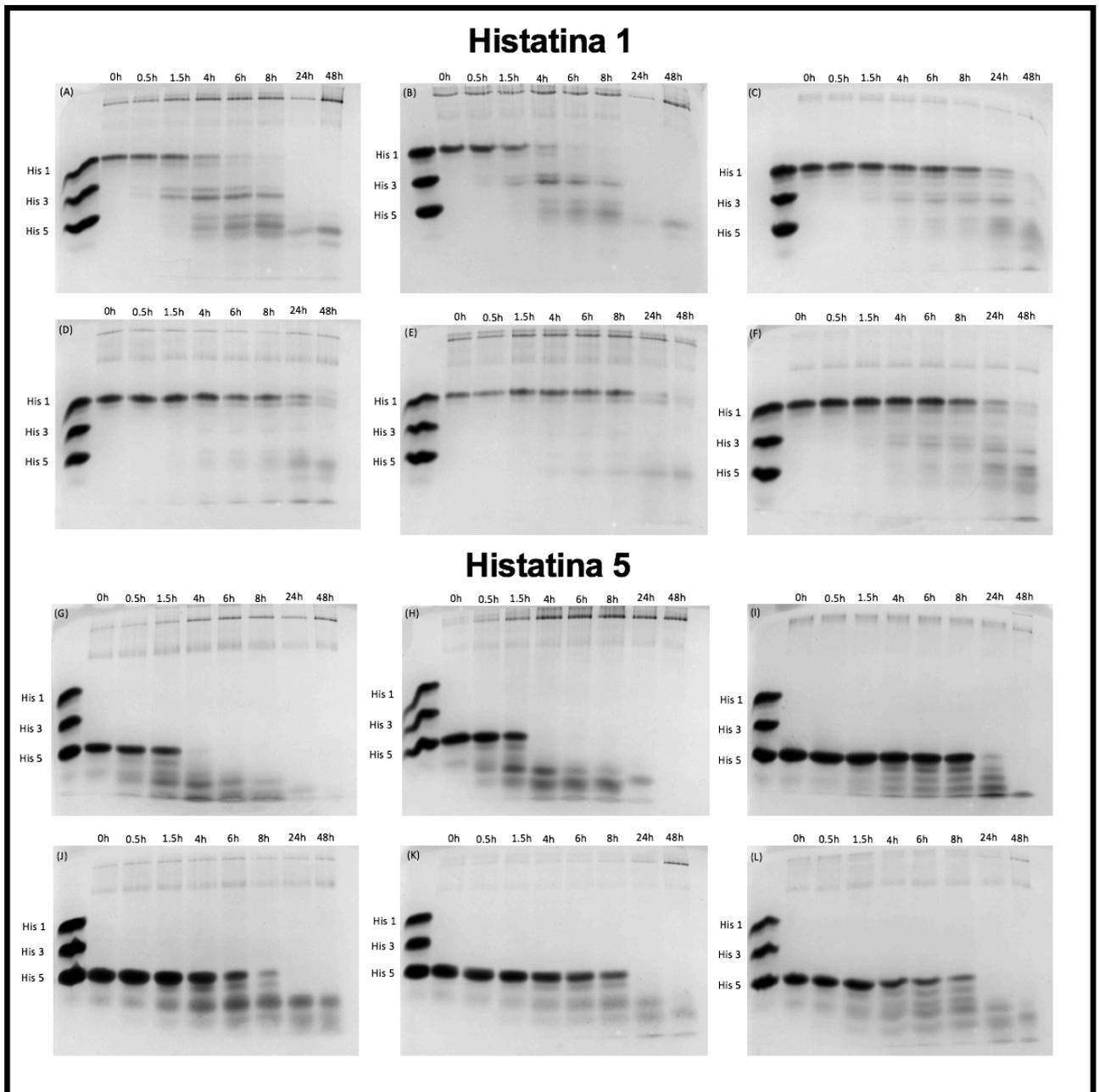
**Figura 13** - Imagens dos géis de Poliacrilamida Catiônica após eletroforese e coloração com Azul de Coomassie referentes ao grupo não-sindrômico com doença periodontal.



A primeira coluna da esquerda corresponde as bandas do padrão de histatina e as demais colunas mostram o processo de degradação das histatinas e a formação dos produtos nos diferentes períodos de incubação ( $t=0$ ; 0,5; 1,5; 4; 6; 8; 24 e 48 horas). As imagens dos géis de (A) até (F) representam a degradação da histatina 1 e de (G) até (L) representam a degradação da histatina 5 nas amostras individuais de SST (1:10).

Fonte: Autoria própria.

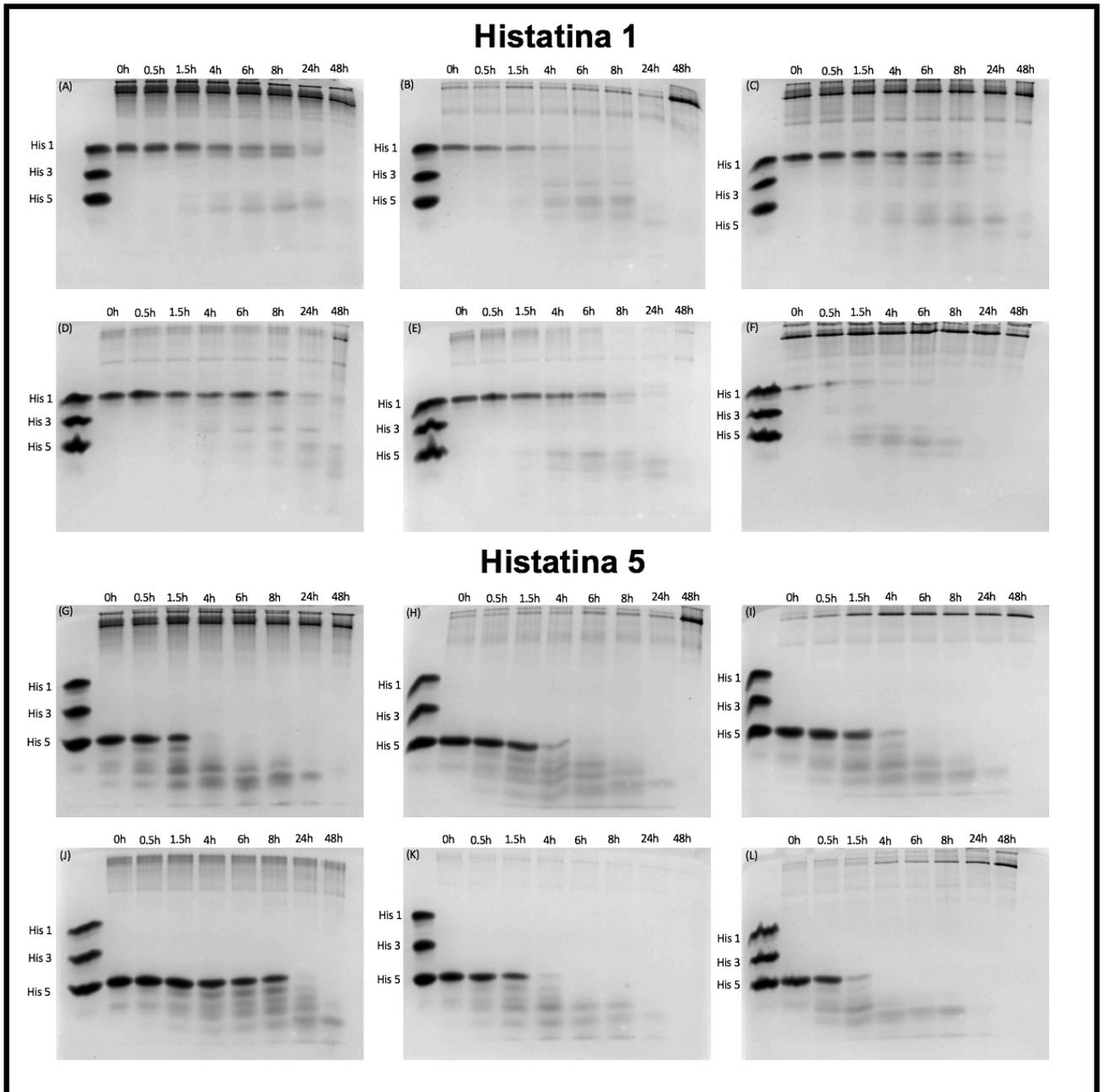
**Figura 14** - Imagens dos géis de Poliacrilamida Catiônica após eletroforese e coloração com Azul de Coomassie referentes ao grupo síndrome de Down sem doença periodontal.



A primeira coluna da esquerda corresponde as bandas do padrão de histatina e as demais colunas mostram o processo de degradação das histatinas e a formação dos produtos nos diferentes períodos de incubação ( $t=0$ ; 0,5; 1,5; 4; 6; 8; 24 e 48 horas). As imagens dos géis de (A) até (F) representam a degradação da histatina 1 e de (G) até (L) representam a degradação da histatina 5 nas amostras individuais de SST (1:10).

Fonte: Autoria própria.

**Figura 15** - Imagens dos géis de Poliacrilamida Catiônica após eletroforese e coloração com Azul de Coomassie referentes ao grupo síndrome de Down com doença periodontal.



A primeira coluna da esquerda corresponde as bandas do padrão de histatina e as demais colunas mostram o processo de degradação das histatinas e a formação dos produtos nos diferentes períodos de incubação ( $t=0; 0,5; 1,5; 4; 6; 8; 24$  e  $48$  horas). As imagens dos géis de (A) até (F) representam a degradação da histatina 1 e de (G) até (L) representam a degradação da histatina 5 nas amostras individuais de SST (1:10).

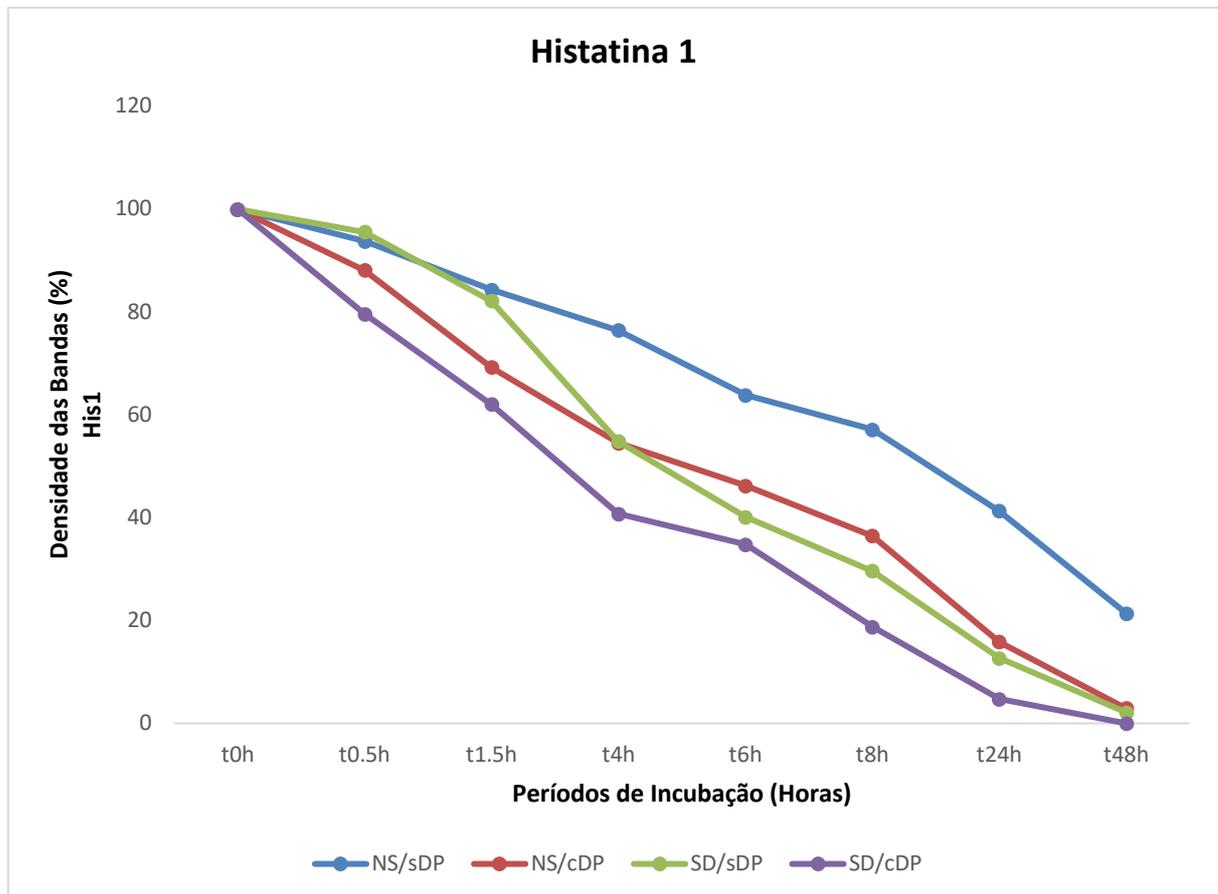
Fonte: Autoria própria.

**Tabela 7** – Densidade das bandas (%) (média;  $\pm$ desvio padrão), em relação a banda de referência (t=0), respectivamente para histatina 1 e histatina 5, durante os diferentes períodos de incubação nas amostras individuais de SST (1:10) de cada grupo.

	Período de Incubação	Grupos			
		Não-sindrômico		Síndrome de Down	
		Sem DP (n=6)	Com DP (n=6)	Sem DP (n=6)	Com DP (n=6)
<b>Densidade das Bandas (%) - His1</b>	0h	100,00 ( $\pm$ 0,00)			
	0,5h	93,78 ( $\pm$ 3,90)	88,14 ( $\pm$ 11,91)	95,57 ( $\pm$ 2,65)	79,58 ( $\pm$ 22,13)
	1,5h	84,32 ( $\pm$ 5,18)	69,23 ( $\pm$ 25,13)	88,16 ( $\pm$ 13,11)	62,02 ( $\pm$ 23,39)
	4h	76,46 ( $\pm$ 17,81)	54,55 ( $\pm$ 25,54)	54,85 ( $\pm$ 26,98)	40,73 ( $\pm$ 25,12)
	6h	63,84 ( $\pm$ 16,90)	46,23 ( $\pm$ 26,43)	40,11 ( $\pm$ 28,14)	34,76 ( $\pm$ 25,87)
	8h	57,12 ( $\pm$ 19,34)	36,43 ( $\pm$ 22,96)	29,62 ( $\pm$ 23,15)	18,79 ( $\pm$ 15,33)
	24h	41,28 ( $\pm$ 23,26)	15,82 ( $\pm$ 13,52)	12,65 ( $\pm$ 10,60)	4,76 ( $\pm$ 4,06)
	48h	21,40 ( $\pm$ 15,03)	2,90 ( $\pm$ 3,74)	2,13 ( $\pm$ 3,55)	0,00 ( $\pm$ 0,00)
<b>Densidade das Bandas (%) - His5</b>	0h	100,00 ( $\pm$ 0,00)			
	0,5h	94,42 ( $\pm$ 5,46)	77,59 ( $\pm$ 18,79)	89,16 ( $\pm$ 10,24)	82,22 ( $\pm$ 12,16)
	1,5h	80,50 ( $\pm$ 13,64)	46,05 ( $\pm$ 36,13)	76,26 ( $\pm$ 19,50)	54,48 ( $\pm$ 27,43)
	4h	55,01 ( $\pm$ 20,65)	17,47 ( $\pm$ 19,22)	44,26 ( $\pm$ 34,35)	15,32 ( $\pm$ 27,38)
	6h	39,22 ( $\pm$ 22,71)	9,99 ( $\pm$ 15,72)	32,41 ( $\pm$ 27,23)	8,20 ( $\pm$ 19,71)
	8h	24,88 ( $\pm$ 14,01)	4,49 ( $\pm$ 10,05)	20,11 ( $\pm$ 22,03)	6,43 ( $\pm$ 15,75)
	24h	0,00 ( $\pm$ 0,00)	0,00 ( $\pm$ 0,00)	1,01 ( $\pm$ 2,48)	0,00 ( $\pm$ 0,00)
	48h	0,00 ( $\pm$ 0,00)			

DP=Doença periodontal.  
Fonte: Autoria própria.

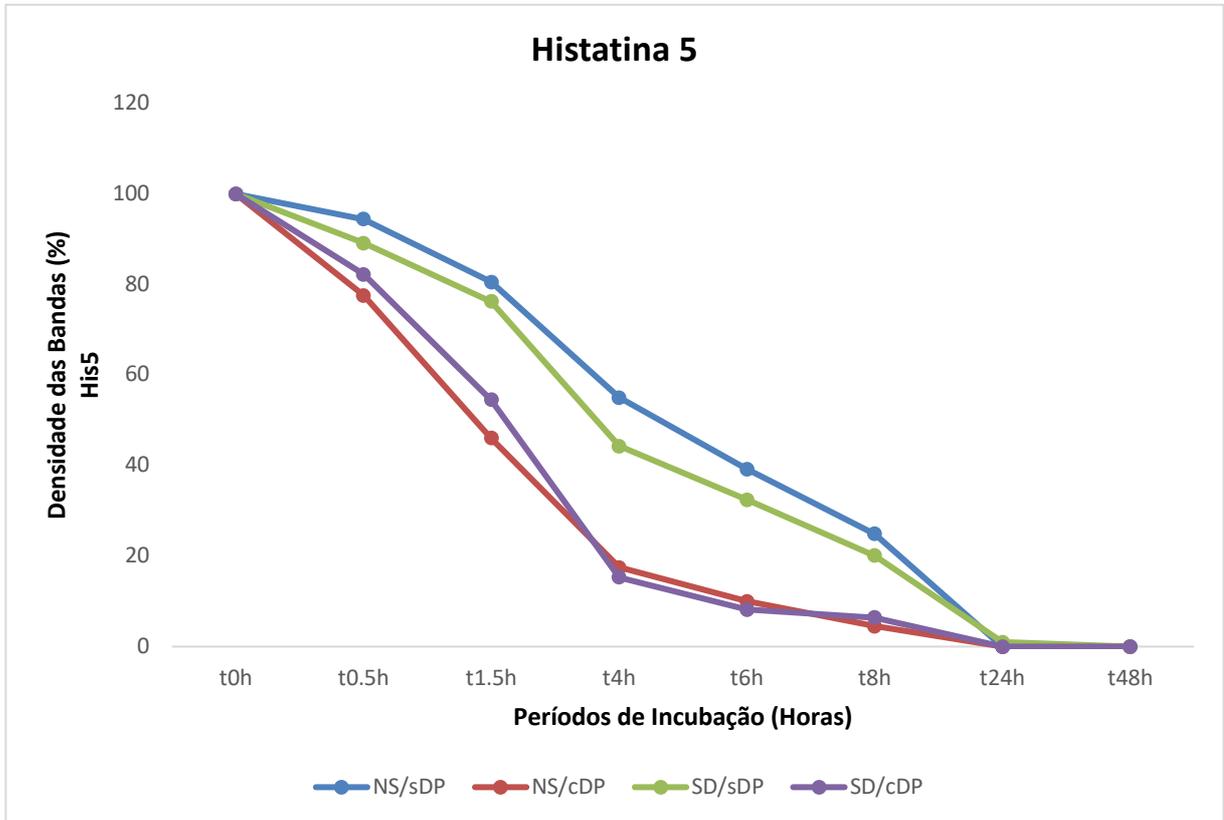
**Gráfico 1** – Comparação da degradação da histatina 1 entre os grupos do estudo durante diferentes períodos de incubação. Média da densidade das bandas (%) da histatina 1.



NSsDP=Não-sindrômico sem doença periodontal (controle); NScDP=Não-sindrômico com doença periodontal; SDsDP=Síndrome de Down sem doença periodontal e SDcDP=Síndrome de Down com doença periodontal.

Fonte: Autoria própria.

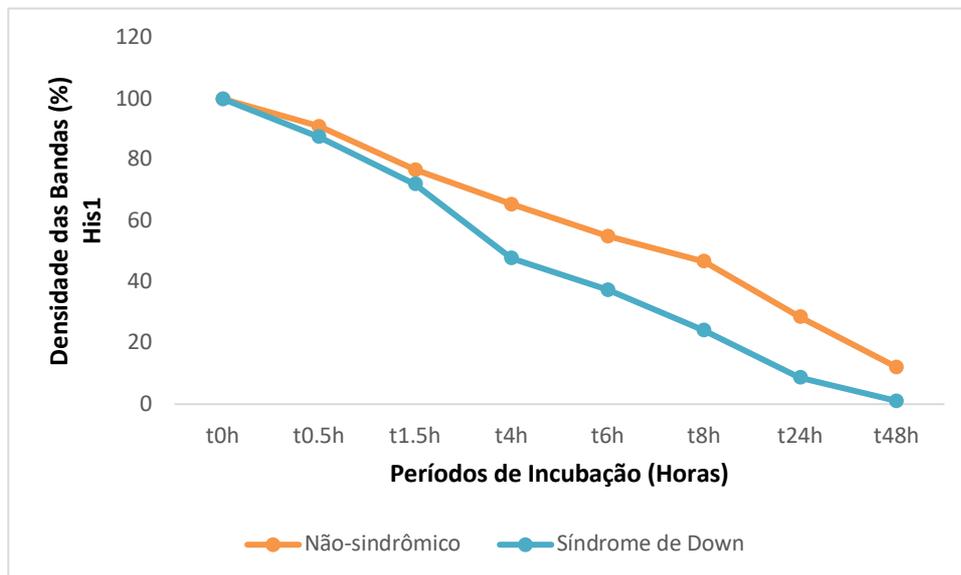
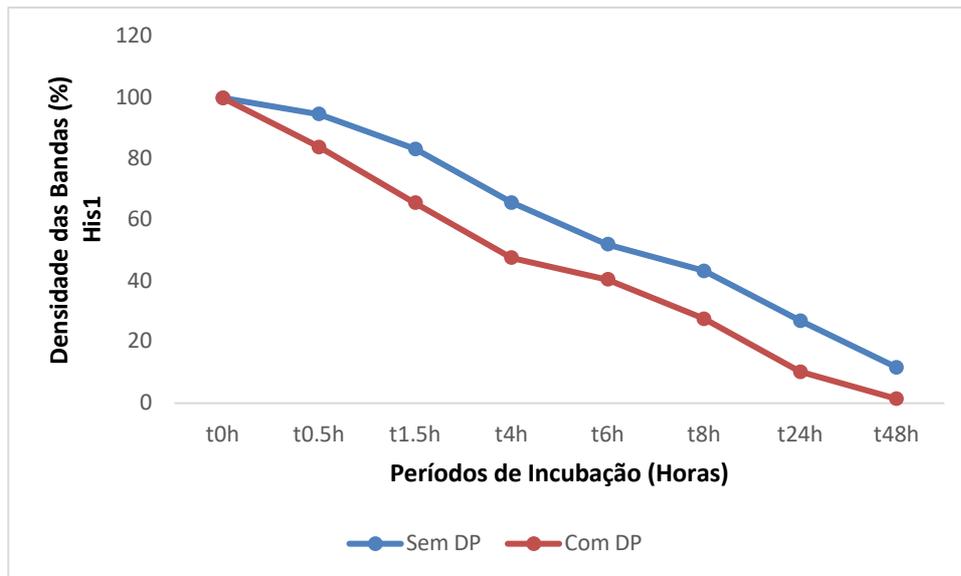
**Gráfico 2** – Comparação da degradação da histatina 5 entre os grupos do estudo durante diferentes períodos de incubação. Média da densidade das bandas (%) da histatina 5.



NSsDP=Não-sindrômico sem doença periodontal (controle); NScDP=Não-sindrômico com doença periodontal; SDsDP=Síndrome de Down sem doença periodontal e SDcDP=Síndrome de Down com doença periodontal.

Fonte: Autoria própria.

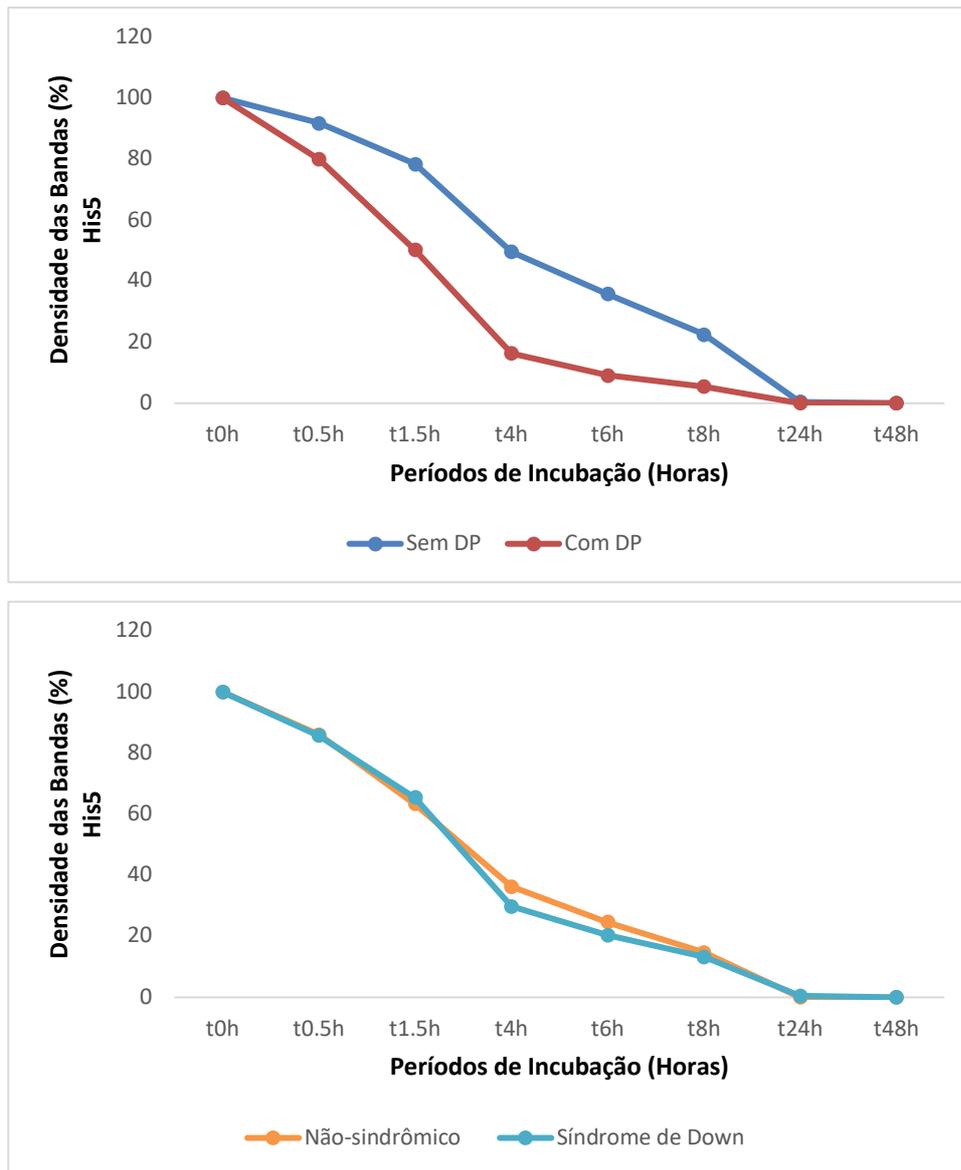
**Gráfico 3** – Influência da presença da doença periodontal e da síndrome de Down na degradação da histatina 1 nas amostras individuais de SST (1:10) durante diferentes períodos de incubação. Média da densidade das bandas (%) da histatina 1.



DP=Doença periodontal; SD=Síndrome de Down

Fonte: Autoria própria.

**Gráfico 4** – Influência da presença da doença periodontal e da síndrome de Down na degradação da histatina 5 nas amostras individuais de SST (1:10) durante diferentes períodos de incubação. Média da densidade das bandas (%) da histatina 5.



DP=Doença periodontal; SD=Síndrome de Down  
 Fonte: Autoria própria.

## 6 DISCUSSÃO

No presente estudo, as características demográficas e os parâmetros clínicos foram avaliados para que fosse possível alocar os pacientes nos grupos de estudo propostos (Tabela 1). Visto que o grupo NScDP apresentou uma maior mediana da idade comparado aos grupos SDcDP e SDsDP ( $p=0,046$ ), fica evidente que a DP afeta indivíduos adultos cromossomicamente normais durante a meia idade de vida<sup>82</sup>. Por outro lado, estes resultados também refletem a manifestação precoce da DP nos indivíduos com SD, o que já foi demonstrado pela literatura<sup>6,8,9,18,77</sup>. Também foi verificado neste estudo fluxo salivar reduzido nos indivíduos com SD ( $p<0,001$ ), o que condiz com os resultados apresentados por outros autores<sup>3-5,159,160</sup>. De acordo com Chaushu et al.<sup>159</sup> (2002), a hipossalivação nos indivíduos com SD pode estar relacionada com fatores inerentes à esta alteração genética.

A diminuição do fluxo salivar pode contribuir para o aumento do risco à cárie dentária, já que este fluido é responsável pelo *clearance* e tamponamento dos ácidos produzidos na cavidade bucal<sup>104,105</sup>. Entretanto, no presente estudo não foi possível relacionar o baixo fluxo salivar com a experiência de cárie dentária, uma vez que todos os grupos apresentaram valores semelhantes de índice CPO-D. Estes resultados reforçam que a doença cárie é multifatorial e biofilme-açúcar dependente<sup>161</sup>, ou seja, não é possível atribuir o seu desenvolvimento à um único fator de risco.

Estudos anteriores demonstraram que indivíduos com SD possuem maiores índices de inflamação gengival comparados a indivíduos não-sindrômicos e com deficiência mental, com acúmulo de biofilme semelhante<sup>89,90</sup>. Nossos achados mostram que o IPV (% faces) foi semelhante entre os grupos SDcDP e NScDP. Também não foi verificada diferença estatística entre esses grupos, em relação aos índices SM e SS. Baseado na literatura<sup>6,8,9,77</sup>, indivíduos com SD apresentam uma maior prevalência à DP em comparação aos indivíduos não-sindrômicos, contudo, de acordo com os critérios de inclusão deste estudo, foram incluídos nos grupos NScDP e SDcDP, indivíduos que apresentavam  $PS \geq 4$  mm, presença de SS e  $NI > 3$ mm em pelo menos oito sítios ou mais não adjacentes, buscando níveis semelhantes de DP entre os grupos NS e SD.

A quantificação das bactérias, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e *Porphyromonas gingivalis*, foi realizada pela técnica da qPCR. Esta técnica é bastante sensível, portanto, é capaz de detectar as bactérias de interesse mesmo

que estejam presentes em baixos níveis<sup>162</sup>. Ambas as bactérias periodontopatogênicas investigadas foram detectadas nas amostras de saliva dos participantes deste estudo. Foi verificada ausência de diferença estatística no número de cópias do gene 16rRNA entre os grupos ( $p=0,803$ ) para *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Tabela 2). Sabe-se que esta bactéria está bastante envolvida no desenvolvimento da periodontite agressiva<sup>163</sup>, o que justifica o resultado obtido, uma vez que a amostra foi composta por indivíduos sem DP e indivíduos com periodontite crônica. Estudos anteriores que compararam quantidades de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* entre indivíduos com SD e controles não – síndrômicos, também verificaram ausência de diferença significativa<sup>5,13,164</sup>. A presença de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* na microbiota bucal é menor que a de outros patógenos como *Porphyromonas gingivalis* e *Fusobacterium nucleatum*<sup>165</sup> e que a presença deste micro-organismo pode estar relacionada com a severidade da DP<sup>17</sup>. Entretanto, em estudo anterior, Amano et al.<sup>14</sup> (2000), identificou *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* em amostras de biofilme de crianças com SD entre 2 e 4 anos de idade, demonstrando a colonização precoce da cavidade bucal destes indivíduos por este patógeno. Assim, tem sido sugerido que existe a possibilidade de que a espécie *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* possa ser detectada em sítios periodontalmente saudáveis<sup>14,166</sup>.

Com relação a *Porphyromonas gingivalis*, neste estudo verificou-se uma quantidade significativamente aumentada deste periodontopatógeno no grupo NScDP comparado aos grupos sem DP ( $p=0,022$ ), independentemente da presença da SD (Tabela 2). Este resultado era esperado uma vez que esta bactéria está relacionada com o desenvolvimento da periodontite crônica<sup>167</sup>. Segundo a literatura, indivíduos com SD apresentam níveis mais elevados de *Porphyromonas gingivalis* comparados aos indivíduos não – síndrômicos<sup>13,14,91,164</sup>. Entretanto, no presente estudo, não foi verificada diferença estatística nas comparações entre os grupos SDcDP e NScDP, SDsDP e NSsDP e entre SDcDP e SDsDP para as quantidades de *Porphyromonas gingivalis* nas amostras de saliva analisadas. Corroborando com estes resultados, Domingues et al.<sup>5</sup> (2017) também não observaram diferenças significativas na quantificação de bactérias periodontopatogênicas, em amostras de saliva, entre crianças com SD e o controle não-sindrômico. Por outro lado, estudos realizados com amostras de biofilme subgingival<sup>13,14,91</sup> e saliva total<sup>164</sup> verificaram

um aumento significativo nos níveis de bactérias periodontopatogênicas nos indivíduos com SD comparados aos indivíduos NS. De acordo com Umeda et al.<sup>168</sup> (1998), o uso exclusivo de saliva para realizar a quantificação de bactérias periodontopatogênicas pode subestimar a presença de algumas espécies como *Tannerella forsythia* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, comparadas ao biofilme subgengival. Entretanto, foi demonstrado que existe uma correlação positiva entre os níveis de periodontopatogênicos em amostras de saliva e de biofilme subgengival de indivíduos com periodontite crônica e periodontite agressiva<sup>169</sup>, o que justifica a utilização de saliva total para esta finalidade. O que pode ter influenciado os resultados do presente estudo é o tamanho da amostra (n=6 por grupo), já que os outros trabalhos citados, diferentemente deste, tinham como um dos principais objetivos comparar os níveis de bactérias em indivíduos síndrômicos e não-síndrômicos, e os grupos foram compostos por um maior número de indivíduos.

A identificação das proteínas presentes nas amostras de saliva dos indivíduos incluídos neste estudo foi realizada com o equipamento LC-ESI-MS/MS. Neste método, primeiramente ocorre a separação por cromatografia líquida das moléculas proteicas, seguida da injeção das mesmas por *electrospray* para o interior da câmara de espectrometria de massa. Em seguida, as partículas sofrem ionização, e, então, são identificadas pela relação massa/carga. Uma segunda análise espectrométrica é realizada na sequência para melhorar a resolução nas áreas de interesse<sup>170</sup>. Os resultados obtidos a partir desta análise mostraram diferenças na abundância de algumas proteínas entre os grupos estudados, o que era esperado uma vez que foram avaliados indivíduos com SD e NS, ambos sem e com DP (Figura 10 e Tabelas 4 a 6).

A  $\alpha$ -amilase apresentou menor abundância nos grupos com SD em relação ao grupo não-sindrômico controle (razão SDsDP/NSsDP: 0,29 e razão SDcDP/NSsDP: 0,24). Essa proteína apresenta afinidade por algumas espécies de estreptococos<sup>119,120</sup>, assim, quando está presente na película adquirida pode atuar como receptora de micro-organismos, promovendo a adesão dos mesmos sobre o esmalte dentário<sup>117</sup>. Desta forma, a redução nos níveis de  $\alpha$ -amilase em indivíduos com SD pode atuar como um fator protetor a instalação e desenvolvimento da cárie dentária. Outra propriedade da  $\alpha$ -amilase reportada pela literatura é a capacidade de promover a morte celular de bactérias periodontopatogênicas, como *Porphyromonas*

*gingivalis*<sup>171</sup>. Assim menores níveis dessa proteína, podem estar relacionados com maiores níveis dessa bactéria, bem como com a maior prevalência de DP nos indivíduos com SD em relação aos NS. Em indivíduos NS, a menor abundância desta proteína também pode corroborar com a presença de DP, conforme foi observado no presente estudo (razão NScDP/NSsDP: 0,51).

As cistatinas são inibidoras naturais de cisteína protease, atuando na proteção e regulação durante o processo de inflamação<sup>121,172</sup>. No presente estudo, a cistatina-S e a cistatina-B mostraram-se diminuídas nos grupos NScDP, SDsDP e SDcDP em comparação ao grupo controle (razão NScDP/NSsDP: 0,74, SDsDP/NSsDP: 0,42 e SDcDP/NSsDP: 0,25 para cistatina-S, e razão NScDP/NSsDP: 0,52, SDsDP/NSsDP: 0,86 e SDcDP/NSsDP: 0,48 para cistatina-B), apontando que a presença da DP e da SD influenciaram os níveis de cistatinas salivares. Estudos anteriores, apresentaram resultados conflitantes quando os níveis de cistatinas na saliva de indivíduos sem DP e com DP foram comparados. Aguirre et al.<sup>173</sup> (1992), observaram ausência de diferença estatística na concentração de cistatinas salivares entre os grupos de indivíduos periodontalmente saudáveis e doentes, enquanto que outros estudos, utilizando uma abordagem proteômica, apontam níveis significativamente mais elevados destas proteínas na ausência da DP<sup>174-176</sup>. As cistatinas são proteínas com propriedade antimicrobiana<sup>122</sup> e os níveis reduzidos destas proteínas na presença da DP podem indicar um mecanismo compensatório frente à quantidade aumentada de bactérias periodontopatogênicas. Já para os indivíduos com SD, corroborando com os resultados do presente estudo, Cabras et al.<sup>177</sup> (2013) verificaram uma redução da cistatina-S e da cistatina-B em comparação aos controles não-sindômicos. Estes achados também podem estar relacionados com a quantidade aumentada de periodontopatógenos na cavidade bucal dos indivíduos com SD<sup>16,17,91</sup> e resposta inflamatória exacerbada<sup>10,11</sup>.

Além das cistatinas, outras proteínas também apresentaram menor abundância nos grupos NScDP, SDsDP e SDcDP em comparação ao grupo controle, como a proteína induzida por prolactina (razão NScDP/NSsDP: 0,75, SDsDP/NSsDP: 0,63 e SDcDP/NSsDP: 0,67) e a Tiorredoxina (razão NScDP/NSsDP: 0,27, SDsDP/NSsDP: 0,64 e SDcDP/NSsDP: 0,27). A proteína induzida por prolactina possui a propriedade de inibir o crescimento bacteriano por meio da adesão à superfície destes micro-organismos<sup>178</sup>, assim, os baixos níveis desta proteína nas amostras de saliva dos indivíduos com DP e com SD encontrados

neste estudo são bastante coerentes. Além disso, outros trabalhos verificaram níveis reduzidos da proteína induzida por prolactina na saliva de pacientes com gengivite<sup>175</sup> e periodontite crônica<sup>174</sup>, corroborando com os resultados obtidos no presente estudo. Com relação a Tiorredoxina, está estabelecido que esta proteína participa de vias intra-celulares, como a do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a fim de reduzir o estresse oxidativo<sup>179</sup>. Desta maneira, a redução da abundância desta proteína nos grupos NScDP, SDsDP e SDcDP pode ser associada ao aumento de estresse oxidativo e dano tecidual, já bem estabelecido pela literatura nos indivíduos com SD<sup>5,12</sup> e também durante a progressão da DP<sup>102</sup>.

A  $\alpha$ -enolase é uma proteína com função glicolítica, além de possuir outras diferentes propriedades regulatórias como, por exemplo, a de atuar como uma proteína de estresse hipóxica<sup>180</sup>. Alguns estudos tem demonstrado níveis elevados de  $\alpha$ -enolase no cérebro de pacientes com doença de Alzheimer<sup>181,182</sup>. Sabe-se que a doença de Alzheimer se manifesta precocemente em indivíduos com SD, o que está muito relacionado ao elevado estresse oxidativo e envelhecimento precoce<sup>73</sup>. Os participantes com SD do presente estudo exibiram valores elevados de  $\alpha$ -enolase em comparação ao grupo NSsDP (controle) (razão SDsDP/NSsDP: 1,40 e SDcDP/NSsDP: 2,20), o que pode estar associado a maior susceptibilidade destes indivíduos ao desenvolvimento da doença de Alzheimer.

Vários estudos avaliaram a degradação das histatinas em indivíduos com periodonto saudável utilizando amostras de SST (1:10) a fim de retardar este processo e ser possível a avaliação e quantificação dos produtos gerados durante degradação destas proteínas<sup>26,27,32,52,60,183</sup>, entretanto, pouco se sabe sobre este processo na presença da DP<sup>184</sup>. McDonald et al.<sup>32</sup> (2011) realizando análise por meio de HPLC em amostras de SST (1:10) de indivíduos periodontalmente saudáveis, verificaram o surgimento de produtos de degradação da histatina 1 após 0,5 h de incubação. Além disso, no estudo de Sun et al.<sup>60</sup> (2009) foi possível observar que a histatina 1 resistiu à proteólise até 40 h de incubação. No presente estudo, foi verificada a formação de produtos de degradação da histatina 1 após 1,5 h de incubação e, também, foi possível observar até 48 h de incubação a marcação da banda com a mesma mobilidade eletroforética do padrão da histatina 1 no grupo NSsDP (controle) (Figura 12). A mensuração da densidade das bandas (%) mostrou que com 1,5 h de incubação apenas 15,68% da histatina 1 foi degradada e que esta

taxa aumentou para 78,60% no período de 48 h (Tabela 7). Entretanto, resultados divergentes foram apresentados pela literatura, em que foi demonstrada uma perda de 50,00% da histatina 1 com 1,5 h de incubação<sup>60</sup>, bem como taxas de perda que variaram entre 83,00% e 96,00% em apenas 2 h de incubação<sup>27,32</sup>.

Com relação à histatina 5, foi observado no presente estudo, o surgimento dos produtos de degradação no grupo NSsDP (controle) após 0,5 h de incubação e este processo se intensificou entre 4 e 8 h (Figura 12). De acordo com Helmerhorst et al.<sup>26</sup> (2006), a análise por HPLC mostrou que a formação de fragmentos da histatina 5 foi mais intensa entre os períodos de 4 e 14 h. Além disso, longos períodos de incubação de até 48 h, levaram ao aparecimento de fragmentos menores e a ausência completa da histatina 5 em sua forma intacta. Corroborando com estes achados, neste estudo, longos períodos de incubação culminaram com a completa degradação da histatina 5. Também foi verificado que aproximadamente 75,10% desta proteína foi degradada após 8 h de incubação (Tabela 7). Por outro lado, outros estudos verificaram uma redução de 75,00% em apenas 1,5 h de incubação<sup>52,60</sup> e degradação completa da proteína após 8 h de incubação<sup>52</sup>.

Estes resultados conflitantes podem ser explicados, em parte, devido a utilização de diferentes metodologias (HPLC e espectrometria de massas) para avaliar o processo de degradação das histatinas nos estudos citados<sup>26,27,32,52,60,183</sup>. Além disso, deve-se considerar diferenças interindividuais entre os participantes destes estudos, já que está bem estabelecido que existe uma variação na atividade proteolítica salivar<sup>26,29,183</sup>. É importante salientar que as diferenças observadas correspondem às análises salivares em indivíduos não-sindrômicos e periodontalmente saudáveis. Até onde é do conhecimento dos autores, este é o primeiro estudo que avaliou a degradação das histatinas na presença da SD e pouco foi publicado na literatura abordando a degradação das histatinas na presença da DP<sup>184</sup>. Thomadaki et al.<sup>184</sup> (2013), compararam a taxa de degradação da histatina 5 entre indivíduos sem DP e com DP utilizando PAGE catiônico nos períodos de incubação 0 h, 0,5 h, 1,5 h e 3 h. Os autores não observaram diferenças significativas entre os grupos, diferentemente do presente estudo, em que diferenças significativas na taxa de degradação da histatina 5 entre os indivíduos sem DP e com DP foram verificadas ( $p=0,005$ ) (Figura 13, Tabela 7 e Gráfico 4). Esta divergência entre os resultados pode ser explicada, uma vez que, Thomadaki et al.<sup>184</sup> (2013) avaliaram o processo de degradação da histatina 5 apenas até 3 h de

incubação e não coletaram dados referentes ao índice de placa e às condições sistêmicas dos participantes, o que pode influenciar a atividade proteolítica.

No presente estudo, a histatina 5 apresentou uma degradação mais rápida comparada à histatina 1 ( $p \leq 0,0001$ ) (Gráficos 1 a 4). Além disso, foi observado que a histatina 5 levou 24 h para atingir níveis não detectáveis nos grupos deste estudo, enquanto que, a histatina 1 resistiu a degradação até 48 h em todos os grupos, com exceção do grupo SDcPD. Desta maneira, os resultados obtidos podem indicar que a histatina 1 é mais resistente à proteólise do que a histatina 5. A literatura demonstrou que os níveis de histatina 1 na saliva são mais elevados que os níveis de histatina 5<sup>183</sup>, o que pode influenciar a velocidade do processo de degradação. Também deve-se considerar que a histatina 1 é composta por 38 resíduos de aminoácidos, diferentemente da histatina 5 que apresenta apenas 24 resíduos de aminoácidos e é um produto originado a partir da clivagem da histatina 3<sup>33</sup>. Todos estes fatores podem atuar favorecendo a cascata da degradação da histatina 5. Sun et al.<sup>60</sup> (2009) também observaram que a histatina 1 é mais resistente a proteólise comparada à histatina 5. No período de 1,5 h de incubação foi verificada uma degradação de 50,00% da histatina 1, ao passo que a histatina 5 apresentou uma degradação de 75,00% neste mesmo período. Os autores também demonstraram que a eficiência catalítica das proteases presentes no SST segue a ordem histatina 5 > histatina 3 > histatina 1. Além disso, os autores sugeriram que estas proteases possuem uma alta afinidade pelas regiões HRGY e RGYR, as quais não estão presentes na sequência da histatina 1, justificando mais uma vez a resistência desta proteína ao processo de proteólise comparada às outras histatinas na saliva total.

## 7 CONCLUSÃO

Baseado nos resultados deste estudo, pode-se concluir que:

- Existem diferenças de abundância de algumas proteínas salivares na presença da SD e da DP;
- A histatina 1 é mais resistente à proteólise do que a histatina 5;
- A degradação das histatinas 1 e 5 ocorre mais rapidamente na presença da DP e, apenas a histatina 1 sofre influência da presença da SD.

## REFERÊNCIAS\*

1. Korenberg JR, Chen XN, Schipper R, Sun Z, Gonsky R, Gerwehr S, et al. Down syndrome phenotypes: the consequences of chromosomal imbalance. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994; 91(11): 4997-5001.
2. Marques LS, Alcântara CE, Pereira LJ, Ramos-Jorge ML. Down syndrome: a risk factor for malocclusion severity? *Braz Oral Res*. 2015; 29(1): 1-7.
3. Siqueira WL, Bermejo PR, Mustacchi Z, Nicolau J. Buffer capacity, pH, and flow rate in saliva of children aged 2–60 months with Down syndrome. *Clin Oral Invest*. 2005; 9(1): 26–9.
4. Siqueira WL, Siqueira MF, Mustacchi Z, de Oliveira E, Nicolau J. Salivary parameters in infants aged 12 to 60 months with Down syndrome. *Spec Care Dentist*. 2007; 27(5): 202-5.
5. Domingues NB, Mariusso MR, Tanaka MH, Scarel-Caminaga RM, Mayer MPA, Brighenti FL, et al. Reduced salivary flow rate and high levels of oxidative stress in whole saliva of children with Down syndrome. *Spec Care Dentist*. 2017; 37(6): 269-76.
6. Reuland-Bosma W, van Dijk J. Periodontal disease in Down's syndrome: a review. *J Clin Periodontol*. 1986; 13(1): 64-73.
7. Agholme MB, Dahllöf G, Modéer T. Changes of periodontal status in patients with Down syndrome during a 7-year period. *Eur J Oral Sci*. 1999; 107(2): 82-8.
8. Kumar A, Masamatti SS, Viridi MS. Periodontal diseases in children and adolescents: a clinician's perspective part 2. *Dent Update*. 2012; 39(9): 639-42, 645-6, 649-52.
9. Reuland-Bosma W. Dissertations 25 years after date 35. Periodontal disease in Down syndrome: an immunological disorder. *Ned Tijdschr Tandheelkd*. 2013; 120(10): 541-5.
10. Chaushu S, Chaushu G, Zigmund M, Yefenof E, Stabholz A, Shapira J, et al. Age-dependent deficiency in saliva and salivary antibodies secretion in Down's syndrome. *Arch Oral Biol*. 2007; 52(11): 1088-96.
11. Bloemers BL, van Bleek GM, Kimpen JL, Bont L. Distinct abnormalities in the innate immune system of children with Down syndrome. *J Pediatr*. 2010; 156(5): 804-9, 9.e1-9.e5.
12. Garcez ME, Peres W, Salvador M. Oxidative stress and hematologic and biochemical parameters in individuals with Down syndrome. *Mayo Clin Proc*. 2005; 80(12): 1607-11.

---

\* De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/Home/Biblioteca/guia-de-normalizacao-atualizado.pdf>

13. Amano A, Kishima T, Akiyama S, Nakagawa I, Hamada S, Morisaki I. Relationship of periodontopathic bacteria with early-onset periodontitis in Down's syndrome. *J Periodontol.* 2001; 72 (3): 368-73.
14. Amano A, Kishima T, Kimura S, Takiguchi M, Ooshima T, Hamada S, et al. Periodontopathic bacteria in children with Down syndrome. *J Periodontol.* 2000; 71 (2): 249-55.
15. Sakellari D, Arapostathis KN, Konstantinidis A. Periodontal conditions and subgingival microflora in Down syndrome patients. A case-control study. *J Clin Periodontol.* 2005; 32(6): 684-90.
16. Khocht A, Yaskell T, Janal M, Turner BF, Rams TE, Haffajee AD, et al. Subgingival microbiota in adult Down syndrome periodontitis. *J Periodontal Res.* 2012; 47(4): 500-7.
17. Martinez-Martinez RE, Loyola-Rodriguez JP, Bonilla-Garro SE, Patiño-Marin N, Haubek D, Amano A, et al. Characterization of periodontal biofilm in Down syndrome patients: a comparative study. *J Clin Pediatr Dent.* 2013; 37(3): 289-95.
18. Amano A, Murakami J, Akiyama S, Morisaki I. Etiologic factors of early-onset periodontal disease in Down syndrome. *Jpn Dent Sci Rev.* 2008; 44: 118-27.
19. Siqueira WL, Dawes C. The salivary proteome: challenges and perspectives. *Proteomics Clin Appl.* 2011; 5(11-12): 575-9.
20. Buduneli N, Kinane DF. Host-derived diagnostic markers related to soft tissue destruction and bone degradation in periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2011; 38 Suppl 11: 85-105.
21. Nomura Y, Shimada Y, Hanada N, Numabe Y, Kamoi K, Sato T, et al. Salivary biomarkers for predicting the progression of chronic periodontitis. *Arch Oral Biol.* 2012; 57(4): 413-20.
22. Zhang L, Henson BS, Camargo PM, Wong DT. The clinical value of salivary biomarkers for periodontal disease. *Periodontol 2000.* 2009; 51: 25-37.
23. AlMoharib HS, AlMubarak A, AlRowis R, Geevarghese A, Preethanath RS, Anil S. Oral fluid based biomarkers in periodontal disease: part 1. Saliva. *J Int Oral Health.* 2014; 6(4): 95-103.
24. Tabak LA. A revolution in biomedical assessment: the development of salivary diagnostics. *J Dent Educ.* 2001; 65: 1335-9.
25. Loo JA, Yan W, Ramachandran P, Wong DT. Comparative human salivary and plasma proteomes. *J Dent Res.* 2010; 89(10): 1016-23.
26. Helmerhorst EJ, Alagl AS, Siqueira WL, Oppenheim FG. Oral fluid proteolytic effects on histatin 5 structure and function. *Arch Oral Biol.* 2006; 51(12): 1061-70.

27. Siqueira WL, Lee YH, Xiao Y, Held K, Wong W. Identification and characterization of histatin 1 salivary complexes by using mass spectrometry. *Proteomics*. 2012; 12(22): 3426-35.
28. Melino S, Santone C, Di Nardo P, Sarkar B. Histatins: salivary peptides with copper(II)-and zinc(II)-binding motifs: perspectives for biomedical applications. *FEBS J*. 2014; 281 (3): 657-72.
29. Oppenheim FG, Xu T, McMillian FM, Levitz SM, Diamond RD, Offner GD, et al. Histatins, a novel family of histidine-rich proteins in human parotid secretion. Isolation, characterization, primary structure, and fungistatic effects on *Candida albicans*. *J Biol Chem*. 1988; 263(16): 7472-7.
30. Helmerhorst EJ, Venuleo C, Beri A, Oppenheim FG. *Candida glabrata* is unusual with respect to its resistance to cationic antifungal proteins. *Yeast*. 2005; 22: 705-14.
31. Oppenheim FG, Salih E, Siqueira WL, Zhang W, Helmerhorst EJ. Salivary proteome and its genetic polymorphisms. *Ann N Y Acad Sci*. 2007; 1098: 22-50.
32. McDonald EE, Goldberg HA, Tabbara N, Mendes FM, Siqueira WL. Histatin 1 resists proteolytic degradation when adsorbed to hydroxyapatite. *J Dent Res*. 2011; 90(2): 268-72.
33. Lamkin MS, Oppenheim FG. Structural features of salivary function. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1993; 4(3-4): 251-9.
34. Kavanagh K, Dowd S. Histatins: antimicrobial peptides with therapeutic potential. *J Pharm Pharmacol*. 2004; 56(3): 285-9.
35. Puri S, Edgerton M. How does it kill?: understanding the candidacidal mechanism of salivary histatin 5. *Eukaryot Cell*. 2014; 13(8): 958-64.
36. Xu T, Levitz SM, Diamond RD, Oppenheim FG. Anticandidal activity of major human salivary histatins. *Infect Immun*. 1991; 59(8): 2549-54.
37. MacKay BJ, Denepitiya L, Iacono VJ, Krost SB, Pollock JJ. Growth-inhibitory and bactericidal effects of human parotid salivary histidine-rich polypeptides on *Streptococcus mutans*. *Infect Immun*. 1984; 44(3): 695-701.
38. Payne JB, Iacono VJ, Crawford IT, Lepre BM, Bernzweig E, Grossbard BL. Selective effects of histidine-rich polypeptides on the aggregation and viability of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguis*. *Oral Microbiol Immunol*. 1991; 6(3): 169-76.
39. Helmerhorst EJ, Van't Hof W, Veerman EC, Simoons-Smit I, Nieuw Amerongen AV. Synthetic histatin analogues with broad-spectrum antimicrobial activity. *Biochem J*. 1997; 326(Pt 1): 39-45.

40. Murakami Y, Amano A, Takagaki M, Shizukuishi S, Tsunemitsu A, Aimoto S. Purification and characterization from human parotid secretion of a peptide which inhibits hemagglutination of *Bacteroides gingivalis* 381. *FEMS Microbiol Lett.* 1990; 60(3): 275-9.
41. Murakami Y, Takeshita T, Shizukuishi S, Tsunemitsu A, Aimoto S. Inhibitory effects of synthetic histidine-rich peptides on haemagglutination by *Bacteroides gingivalis* 381. *Arch Oral Biol.* 1990; 35(9): 775-7.
42. Gusman H, Travis J, Helmerhorst EJ, Potempa J, Troxler RF, Oppenheim FG. Salivary histatin 5 is an inhibitor of both host and bacterial enzymes implicated in periodontal disease. *Infect Immun.* 2001; 69(3): 1402-8.
43. Borgwardt DS, Martin AD, Van Hemert JR, Yang J, Fischer CL, Recker EN, et al. Histatin 5 binds to *Porphyromonas gingivalis* hemagglutinin B (HagB) and alters HagB-induced chemokine responses. *Sci Rep.* 2014; 4: 3904.
44. Nishikata M, Kanehira T, Oh H, Tani H, Tazaki M, Kuboki Y. Salivary histatin as an inhibitor of a protease produced by the oral bacterium *Bacteroides gingivalis*. *Biochem Biophys Res Commun.* 1991; 174 (2): 625-30.
45. Mickels N, McManus C, Massaro J, Friden P, Braman V, D'Agostino R, et al. Clinical and microbial evaluation of a histatin-containing mouthrinse in humans with experimental gingivitis. *J Clin Periodontol.* 2001; 28(5): 404-10.
46. Paquette DW, Simpson DM, Friden P, Braman V, Williams RC. Safety and clinical effects of topical histatin gels in humans with experimental gingivitis. *J Clin Periodontol.* 2002; 29(12): 1051-8.
47. Van Dyke T, Paquette D, Grossi S, Braman V, Massaro J, D'Agostino R, et al. Clinical and microbial evaluation of a histatin-containing mouthrinse in humans with experimental gingivitis: a phase-2 multi-center study. *J Clin Periodontol.* 2002; 29(2): 168-76.
48. Rothstein DM, Helmerhorst EJ, Spacciapoli P, Oppenheim FG, Friden P. Histatin-derived peptides: potential agents to treat localised infections. *Expert Opin Emerg Drugs.* 2002; 7(1): 47-59.
49. Kousvelari EE, Baratz RS, Burke B, Oppenheim FG. Immunochemical identification and determination of proline-rich proteins in salivary secretions, enamel pellicle, and glandular tissue specimens. *J Dent Res.* 1980; 59(8): 1430-8.
50. Jensen JL, Xu T, Lamkin MS, Brodin P, Aars H, Berg T, et al. Physiological regulation of the secretion of histatins and statherins in human parotid saliva. *J Dent Res.* 1994; 73(12): 1811-7.
51. Helmerhorst EJ. Whole saliva proteolysis: wealth of information for diagnostic exploitation. *Ann N Y Acad Sci.* 2007; 1098: 454-60.

52. Thomadaki K, Helmerhorst EJ, Tian N, Sun X, Siqueira WL, Walt DR, et al. Whole-saliva proteolysis and its impact on salivary diagnostics. *J Dent Res.* 2011; 90(11): 1325-30.
53. Cowman RA, Schaefer SJ, Fitzgerald RJ, Rosner D, Shklair IL, Walter RG. Differential utilization of proteins in saliva from caries-active and caries-free subjects as growth substrates by plaque-forming streptococci. *J Dent Res.* 1979; 58(10): 2019-27.
54. Watanabe T, Ohata N, Morishita M, Iwamoto Y. Correlation between the protease activities and the number of epithelial cells in human saliva. *J Dent Res.* 1981; 60(6): 1039-44.
55. Bruno LS, Li X, Wang L, Soares RV, Siqueira CC, Oppenheim FG, et al. Two-hybrid analysis of human salivary mucin MUC7 interactions. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1746: 65-72.
56. Murakami Y, Shizukuishi S, Tsunemitsu A, Nakashima K, Kato Y, Aimoto S. Binding of a histidine-rich peptide to *Porphyromonas gingivalis*. *FEMS Microbiol Lett* 1991; 66: 253-6.
57. Li XS, Reddy MS, Baev D, Edgerton M. *Candida albicans* Ssa1/ 2p is the cell envelope binding protein for human salivary histatin 5. *J Biol Chem.* 2003; 278: 28553-61.
58. Yin A, Margolis HC, Grogan J, Yao Y, Troxler RF, Oppenheim FG. Physical parameters of hydroxyapatite adsorption and effect on candidacidal activity of histatins. *Arch Oral Biol.* 2003; 48: 361-8.
59. Baum BJ, Bird JL, Millar DB, Longton RW. Studies on histidine-rich polypeptides from human parotid saliva. *Arch Biochem Biophys.* 1976; 177(2): 427-36.
60. Sun X, Salih E, Oppenheim FG, Helmerhorst EJ. Kinetics of histatin proteolysis in whole saliva and the effect on bioactive domains with metal-binding, antifungal, and wound-healing properties. *FASEB J.* 2009; 23(8): 2691-701.
61. Huang CM. Comparative proteomic analysis of human whole saliva. *Arch Oral Biol.* 2004; 49(12): 951-62.
62. Wu Y, Shu R, Luo LJ, Ge LH, Xie YF. Initial comparison of proteomic profiles of whole unstimulated saliva obtained from generalized aggressive periodontitis patients and healthy control subjects. *J Periodontal Res.* 2009; 44(5): 636-44.
63. Lourenço AG, Nakao C, Machado AA, Motta AC, Tonani L, Candido RC, Komesu MC. Lactoferrin, a marker for periodontal disease. *Curr HIV Res.* 2013; 11(3): 220-5.
64. Down JLH. Observation on the ethnic classification of idiots. *London Hosp Rep.* 1866; 3: 259-62.

65. Lejeune J, Gautier M, Turpin R. Study of somatic chromosomes from 9 mongoloid children. *C R Hebd Seances Acad Sci.* 1959; 248(11): 1721-2.
66. Jacobs PA, Baikie AG, Court Brown WM, Strong JA. The somatic chromosomes in mongolismo. *Lancet.* 1959; 1(7075): 710.
67. Organização Mundial da Saúde. Down syndrome. Genes and human diseases. [Internet]. World Health Organization; 2007. [acesso 2018 nov 28]. Disponível em: <http://www.who.int/genomics/public/geneticdiseases/en/index1.html>.
68. Polani PE. Chromosome anomalies. *Annu Rev Med.* 1964; 15: 93-114.
69. Hultén MA, Patel SD, Tankimanova M, Westgren M, Papadogiannakis N, Jonsson AM, et al. On the origin of trisomy 21 Down syndrome. *Mol Cytogenet* 2008; 1: 21.
70. Flores-Ramírez F, Palacios-Guerrero C, García-Delgado C, Morales-Jiménez AB, Arias-Villegas CM, Cervantes A, et al. Cytogenetic profile in 1,921 cases of trisomy 21 syndrome. *Arch Med Res.* 2015; 46(6): 484–9.
71. Desai S. Down syndrome: a review of the literature. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1997; 84(3):279-85.
72. Kava MP, Tullu MS, Muranjan MN, Girisha K.M. Down syndrome: clinical profile from india. *Arch Med Res.* 2004; 35(1): 31-5.
73. Abanto J, Ciamponi AL, Francischini E, Murakami C, de Rezende NP, Gallottini M. Medical problems and oral care of patients with Down syndrome: a literature review. *Spec Care Dentist.* 2011; 31(6): 197-203.
74. Margallo-Lana ML, Moore PB, Kay DW, Perry RH, Reid BE, Berney TP, et al. Fifteen-year follow-up of 92 hospitalized adults with Down's syndrome: incidence of cognitive decline, its relationship to age and neuropathology. *J Intellect Disabil Res.* 2007; 51: 463-77.
75. Mubayrik AB. The dental needs and treatment of patients with Down syndrome. *Dent Clin North Am.* 2016; 60(3): 613-26.
76. Macho V, Andrade D, Areias C, Coelho A, Melo PR. Comparative study of the prevalence of occlusal anomalies in Down Syndrome children and their siblings. *Br J Med Res.* 2014; 4(35): 5604–11.
77. Barnett ML, Press KP, Friedman D, Sonnenberg EM. The prevalence of periodontitis and dental caries in a Down's syndrome population. *J Periodontol.* 1986; 57(5): 288-93.

78. Krishnan C, Archana A. Evaluation of oral hygiene status and periodontal health in mentally retarded subjects with or without Down's syndrome in comparison with normal healthy individuals. *J Oral Health Community Dent* 2014; 8(2): 91-4.
79. Pihlstrom BL, Michalowicz BS, Johnson NW. Periodontal diseases. *Lancet*. 2005; 366(9499): 1809-20.
80. Teng YT. Protective and destructive immunity in the periodontium: part 1: innate and humoral immunity and the periodontium. *J Dent Res*. 2006; 85(3): 198-208.
81. Gemmell E, Yamazaki K, Seymour GJ. Destructive periodontitis lesions are determined by the nature of the lymphocytic response. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2002; 13(1): 17-34.
82. Dye BA. Global periodontal disease epidemiology. *Periodontol* 2000. 2012; 58(1): 10-25.
83. Kassebaum NJ, Bernabé E, Dahiya M, Bhandari B, Murray CJ, Marcenes W. Global burden of severe periodontitis in 1990-2010: a systematic review and meta-regression. *J Dent Res*. 2014; 93(11): 1045-53.
84. Albandar JM, Brunelle JA, Kingman A. Destructive periodontal disease in adults 30 years of age and older in the United States, 1988-1994. *J Periodontol*. 1999; 70(1): 13-29.
85. Caton JG, Armitage G, Berglundh T, Chapple ILC, Jepsen S, Kornman K, et al. A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions - Introduction and key changes from the 1999 classification. *J Clin Periodontol*. 2018; 45 Suppl 20: S1-S8.
86. Wiebe CB, Putnins EE. The periodontal disease classification system of the American Academy of Periodontology: an update. *J Can Dent Assoc*. 2000; 66(11): 594-7.
87. Van Dyke TE, Sheilesh D. Risk factors for periodontitis. *J Int Acad Periodontol*. 2005; 7(1): 3-7.
88. Reuland-Bosma W, van der Reijden WA, van Winkelhoff AJ. Absence of a specific subgingival microflora in adults with Down's syndrome. *J Clin Periodontol*. 2001; 28(11): 1004-9.
89. Saxen L, Aula S, Westermarck T. Periodontal disease associated with Down's syndrome: an orthopantomographic evaluation. *J Periodontol*. 1977; 48(6): 337-40.
90. Cichon P, Crawford L, Grimm WD. Early-onset periodontitis associated with Down's syndrome--clinical interventional study. *Ann Periodontol*. 1998; 3(1): 370-80.

91. Tanaka MH, Rodrigues TO, Finoti LS, Teixeira SR, Mayer MP, Scarel-Caminaga RM, et al. The effect of conventional mechanical periodontal treatment on red complex microorganisms and clinical parameters in Down syndrome periodontitis patients: a pilot study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2015; 34(3): 601-8.
92. Izumi Y, Sugiyama S, Shinozuka O, Yamazaki T, Ohyama T, Ishikawa I. Defective neutrophil chemotaxis in Down's syndrome patients and its relationship to periodontal destruction. *J Periodontol*. 1989; 60(5): 238-42.
93. de Hingh YC, van der Vossen PW, Gemen EF, Mulder AB, Hop WC, Brus F, et al. Intrinsic abnormalities of lymphocyte counts in children with down syndrome. *J Pediatr*. 2005; 147(6): 744-7.
94. Lin SJ, Wang JY, Klickstein LB, Chuang KP, Chen JY, Lee JF, et al. Lack of age-associated LFA-1 up-regulation and impaired ICAM-1 binding in lymphocytes from patients with Down syndrome. *Clin Exp Immunol*. 2001; 126(1): 54-63.
95. Barr-Agholme M, Dahllöf G, Modéer T, Engström PE, Engström GN. Periodontal conditions and salivary immunoglobulins in individuals with Down syndrome. *J Periodontol*. 1998; 69(10): 1119-23.
96. Cavalcante LB, Tanaka MH, Pires JR, Apponi LH, Aparecida Giro EM, Valentini SR, et al. Expression of the interleukin-10 signaling pathway genes in individuals with Down syndrome and periodontitis. *J Periodontol*. 2012; 83(7): 926-35.
97. Tsilingaridis G, Yucel-Lindberg T, Modéer T. Enhanced levels of prostaglandin E<sub>2</sub>, leukotriene B<sub>4</sub>, and matrix metalloproteinase-9 in gingival crevicular fluid from patients with Down syndrome. *Acta Odontol Scand*. 2003; 61(3): 154-8.
98. Franciotta D, Verri A, Zardini E, Andreoni L, De Amici M, Moratti R, et al. Interferon-gamma- and interleukin-4-producing T cells in Down's syndrome. *Neurosci Lett*. 2006; 395(1): 67-70.
99. Kedziora J, Bartosz G. Down's syndrome: a pathology involving the lack of balance of reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med*. 1988; 4(5): 317-30.
100. Kim SC, Kim OS, Kim OJ, Kim YJ, Chung HJ. Antioxidant profile of whole saliva after scaling and root planing in periodontal disease. *J Periodontal Implant Sci*. 2010; 40(4): 164-71.
101. Muchová J, Zitnanová I, Duracková Z. Oxidative stress and Down syndrome. Do antioxidants play a role in therapy? *Physiol Res*. 2014; 63(5): 535-42.
102. Wei D, Zhang X-L, Wang Y-Z, Yang C-X, Chen G. Lipid peroxidation levels, total oxidant status and superoxide dismutase in serum, saliva and gingival crevicular fluid in chronic periodontitis patients before and after periodontal therapy. *Aust Dent J*. 2010; 55(1): 70-8.

103. Gabre P, Martinsson T, Gahnberg L. Longitudinal study of dental caries, tooth mortality and interproximal bone loss in adults with intellectual disability. *Eur J Oral Sci.* 2001; 109(1): 20-6.
104. Dawes C, Pedersen AM, Villa A, Ekström J, Proctor GB, Vissink A, et al. The functions of human saliva: a review sponsored by the World Workshop on Oral Medicine VI. *Arch Oral Biol.* 2015; 60(6): 863-74.
105. Humphrey SP, Williamson RT. A review of saliva: normal composition, flow, and function. *J Prosthet Dent.* 2001; 85(2): 162-9.
106. Edgar WM. Saliva and dental health. Clinical implications of saliva: report of a consensus meeting. *Br Dent J.* 1990; 169(3-4): 96-8.
107. Carpenter GH. The secretion, components, and properties of saliva. *Annu Rev Food Sci Technol.* 2013; 4: 267-76.
108. Eliasson L, Carlén A. An update on minor salivary gland secretions. *Eur J Oral Sci.* 2010; 118(5): 435-42.
109. Mandel ID. The role of saliva in maintaining oral homeostasis. *J Am Dent Assoc.* 1989; 119(2): 298-304.
110. Thaysen JH, Thorn NA, Schwartz IL. Excretion of sodium, potassium, chloride and carbon dioxide in human parotid saliva. *Am J Physiol* 1954; 178(1): 155-9.
111. García-Godoy F, Hicks MJ. Maintaining the integrity of the enamel surface: the role of dental biofilm, saliva and preventive agents in enamel demineralization and remineralization. *J Am Dent Assoc.* 2008; 139 Suppl: 25S-34S.
112. Schlesinger DH, Hay DI. Complete covalent structure of statherin, a tyrosine-rich acidic peptide which inhibits calcium phosphate precipitation from human parotid saliva. *J Biol Chem.* 1977; 252(5): 1689-95.
113. Fábíán TK, Hermann P, Beck A, Fejérdy P, Fábíán G. Salivary defense proteins: their network and role in innate and acquired oral immunity. *Int J Mol Sci.* 2012; 13(4): 4295-320.
114. Brandtzaeg, P. Do salivary antibodies reliably reflect both mucosal and systemic immunity? *Ann N Y Acad Sci.* 2007; 1098(1): 288-311.
115. Lee YH, Zimmerman JN, Custodio W, Xiao Y, Basiri T, Hatibovic-Kofman S, Siqueira WL. Proteomic evaluation of acquired enamel pellicle during in vivo formation. *PLoS One.* 2013; 8(7): e67919.
116. Yao Y, Berg EA, Costello CE, Troxler RF, Oppenheim FG. Identification of protein components in human acquired enamel pellicle and whole saliva using novel proteomics approaches. *J Biol Chem.* 2003; 278(7): 5300-8.
117. Scannapieco FA, Torres G, Levine MJ. Salivary alpha-amylase: role in dental plaque and caries formation. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1993; 4(3-4): 301-7.

118. Bergmann JE, Gülzow HJ. Detection of binding of denatured salivary alpha-amylase to *Streptococcus sanguis*. *Arch Oral Biol*. 1995; 40(10): 973-4.
119. Douglas CW, Pease AA, Whiley RA. Amylase-binding as a discriminator among oral streptococci. *FEMS Microbiol Lett*. 1990; 54(1-3): 193-7.
120. Sethi A, Mohanty B, Ramasubbu N, Gooley PR. Structure of amylase-binding protein A of *Streptococcus gordonii*: a potential receptor for human salivary  $\alpha$ -amylase enzyme. *Protein Sci*. 2015; 24(6): 1013-8.
121. Gorr SU. Antimicrobial peptides of the oral cavity. *Periodontol 2000*. 2009; 51: 152-80.
122. Blankenvoorde MF, Henskens YM, van der Weijden GA, van den Keijbus PA, Veerman EC, Nieuw Amerongen AV. Cystatin A in gingival crevicular fluid of periodontal patients. *J Periodontal Res*. 1997; 32(7): 583-8.
123. Blankenvoorde MF, van't Hof W, Walgreen-Weterings E, van Steenberghe TJ, Brand HS, Veerman EC, Nieuw-Amerongen AV. Cystatin and cystatin-derived peptides have antibacterial activity against the pathogen *Porphyromonas gingivalis*. *Biol Chem*. 1998; 379: 1371-5.
124. Choi S, Baik JE, Jeon JH, Cho K, Seo DG, Kum KY, et al. Identification of *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide-binding proteins in human saliva. *Mol Immunol*. 2011; 48(15-16): 2207-13.
125. Henskens YM, Van der Velden U, Veerman EC, Nieuw Amerongen AV. Cystatin C levels of whole saliva are increased in periodontal patients. *Ann N Y Acad Sci*. 1993; 694: 280-2.
126. Sharma A, Pradeep AR, Raghavendra NM, Arjun P, Kathariya R. Gingival crevicular fluid and serum cystatin c levels in periodontal health and disease. *Dis Markers*. 2012; 32(2): 101-7.
127. Dijkema T, Terhaard CH, Roesink JM, Raaijmakers CP, van den Keijbus PA, Brand HS, et al. MUC5B levels in submandibular gland saliva of patients treated with radiotherapy for head-and-neck cancer: a pilot study. *Radiat Oncol*. 2012; 7: 91.
128. Antonyraj KJ, Karunakaran T, Raj PA. Bactericidal activity and poly-L-proline II conformation of the tandem repeat sequence of human salivary mucin glycoprotein (MG2). *Arch Biochem Biophys*. 1998; 356(2): 197-206.
129. Groenink J, Walgreen-Weterings E, Nazmi K, Bolscher JG, Veerman EC, van Winkelhoff AJ, Nieuw Amerongen AV. Salivary lactoferrin and low-Mr mucin MG2 in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-associated periodontitis. *J Clin Periodontol*. 1999; 26(5): 269-75.
130. Lis M, Liu TT, Barker KS, Rogers PD, Bobek LA. Antimicrobial peptide MUC7 12-mer reactivates the calcium/calcineurin pathways of *Candida albicans*. *FEMS Yeast Res*. 2010; 10: 579-86.

131. Situ H, Wei G, Smith CJ, Mashhoon S, Bobek LA. Human salivary MUC7 mucin peptides: effect of size, charge and cysteine residues on antifungal activity. *Biochem J.* 2003; 375(Pt 1): 175-82.
132. Moreno EC, Varughese K, Hay DI. Effect of human salivary proteins on the precipitation kinetics of calcium phosphate. *Calcif Tissue Int.* 1979; 28(1): 7-16.
133. Schwartz SS, Hay DI, Schluckebier SK. Inhibition of calcium phosphate precipitation by human salivary statherin: structure-activity relationships. *Calcif Tissue Int.* 1992; 50: 511-7.
134. Shimotoyodome A, Kobayashi H, Tokimitsu I, Matsukubo T, Takaesu Y. Statherin and histatin 1 reduce parotid saliva-promoted *Streptococcus mutans* strain MT8148 adhesion to hydroxyapatite surfaces. *Caries Res.* 2006; 40(5): 403-11.
135. Leito JT, Ligtenberg AJ, Nazmi K, Veerman EC. Identification of salivary components that induce transition of hyphae to yeast in *Candida albicans*. *FEMS Yeast Res.* 2009; 9(7): 1102-10.
136. Hay DI, Ahern JM, Schluckebier SK, Schlesinger DH. Human salivary acidic proline-rich protein polymorphisms and biosynthesis studied by high-performance liquid chromatography. *J Dent Res.* 1994; 73(11): 1717-26.
137. Hatton MN, Loomis RE, Levine MJ, Tabak LA. Masticatory lubrication. The role of carbohydrate in the lubricating property of a salivary glycoprotein-albumin complex. *Biochem J.* 1985; 230(3): 817-20.
138. Siqueira WL, Margolis HC, Helmerhorst EJ, Mendes FM, Oppenheim FG. Evidence of intact histatins in the in vivo acquired enamel pellicle. *J Dent Res.* 2010; 89(6): 626-30.
139. Tsai H, Bobek LA. Human salivary histatin-5 exerts potent fungicidal activity against *Cryptococcus neoformans*. *Biochim Biophys Acta.* 1997; 1336(3): 367-9.
140. van't Hof W, Reijnders IM, Helmerhorst EJ, Walgreen-Weterings E, Simoons-Smit IM, Veerman EC, Amerongen AV. Synergistic effects of low doses of histatin 5 and its analogues on amphotericin B anti-mycotic activity. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 2000; 78(2): 163-9.
141. Oudhoff MJ, Bolscher JG, Nazmi K, Kalay H, van 't Hof W, Amerongen AV, Veerman EC. Histatins are the major wound-closure stimulating factors in human saliva as identified in a cell culture assay. *FASEB J.* 2008; 22(11): 3805-12.
142. Torres P, Castro M, Reyes M, Torres VA. Histatins, wound healing, and cell migration. *Oral Dis.* 2018; 24(7): 1150-60.

143. Boink MA, van den Broek LJ, Roffel S, Nazmi K, Bolscher JG, Gefen A, et al. Different wound healing properties of dermis, adipose, and gingiva mesenchymal stromal cells. *Wound Repair Regen*. 2016; 24(1): 100-9.
144. Sorsa T, Tjäderhane L, Salo T. Matrix metalloproteinases (MMPs) in oral diseases. *Oral Dis*. 2004; 10(6): 311-8.
145. Schenkels LC, Veerman EC, Nieuw Amerongen AV. Biochemical composition of human saliva in relation to other mucosal fluids. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1995; 6(2): 161-75.
146. Iontcheva I, Oppenheim FG, Troxler RF. Human salivary mucin MG1 selectively forms heterotypic complexes with amylase, proline-rich proteins, statherin, and histatins. *J Dent Res*. 1997; 76: 734-43.
147. Moffa EB, Mussi MC, Xiao Y, Garrido SS, Machado MA, Giampaolo ET, Siqueira WL. Histatin 5 inhibits adhesion of *C. albicans* to reconstructed human oral epithelium. *Front Microbiol*. 2015; 6: 885.
148. Moffa EB, Machado MA, Mussi MC, Xiao Y, Garrido SS, Giampaolo ET, Siqueira WL. In vitro Identification of histatin 5 salivary complexes. *PLoS One*. 2015; 10(11): e0142517.
149. Oppenheim FG. Preliminary observations on the presence and origin of serum albumin in human saliva. *Helv Odontol Acta*. 1970; 14(1): 10-7.
150. Xu L, Lal K, Santarpia RP, Pollock JJ. Salivary proteolysis of histidine-rich polypeptides and the antifungal activity of peptide degradation products. *Arch Oral Biol*. 1993; 38(4): 277-83.
151. Rothstein DM, Spacciapoli P, Tran LT, Xu T, Roberts FD, Dalla Serra M, et al. Anticandida activity is retained in P-113, a 12-amino-acid fragment of histatin 5. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001; 45(5): 1367-73.
152. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Censo 2010. [Internet]. IBGE; 2010. [acesso 2018 dez 14]. Disponível em: <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/sp/araraquara/panorama>.
153. Organização Mundial de Saúde. Levantamento epidemiológico básico de saúde bucal: manual de instruções. Genebra: OMS; 1997.
154. Amano A, Nakagawa I, Kataoka K, Morisaki I, Hamada S. Distribution of *Porphyromonas gingivalis* strains with fimA genotypes in periodontitis patients. *J Clin Microbiol*. 1999; 37(5): 1426-30.
155. Ramseier CA, Kinney JS, Herr AE, Braun T, Sugai JV, Shelburne CA, et al. Identification of pathogen and host-response markers correlated with periodontal disease. *J Periodontol*. 2009; 80(3): 436-46.
156. Baum BJ, Bird JL, Longton RW. Polyacrylamide gel electrophoresis of human salivary histidine-rich-polypeptides. *J Dent Res*. 1977; 56(9): 1115-8.

157. Oliveros, JC. An interactive tool for comparing lists with Venn's diagrams. [Internet]. [acesso 2018 out 30]. Disponível em: <http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>.
158. The UniProt Consortium. UniProt: the universal protein knowledgebase. *Nucleic Acids Res.* 2017; 45(D1): D158-D69.
159. Chaushu S, Becker A, Chaushu G, Shapira J. Stimulated parotid salivary flow rate in patients with Down syndrome. *Spec Care Dentist.* 2002; 22(1): 41-4.
160. de Castilho AR, Pardi V, Pereira CV. Dental caries experience in relation to salivary findings and molecular identification of *S. mutans* and *S. sobrinus* in subjects with Down syndrome. *Odontology.* 2011; 99(2): 162-7.
161. Featherstone JD. Dental caries: a dynamic disease process. *Aust Dent J.* 2008; 53(3): 286-91.
162. Lau L, Sanz M, Herrera D, Morillo JM, Martín C, Silva A. Quantitative real-time polymerase chain reaction versus culture: a comparison between two methods for the detection and quantification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythensis* in subgingival plaque samples. *J Clin Periodontol.* 2004; 31(12): 1061-9.
163. Zambon JJ, Christersson LA, Slots J. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease. Prevalence in patient groups and distribution of biotypes and serotypes within families. *J Periodontol.* 1983; 54: 707-11.
164. Faria Carrada C, Almeida Ribeiro Scalioni F, Evangelista Cesar D, Lopes Devito K, Ribeiro LC, Almeida Ribeiro R. Salivary periodontopathic bacteria in children and adolescents with Down syndrome. *PLoS One.* 2016; 11(10): e0162988.
165. Jardim Júnior EG, Bosco JM, Lopes AM, Landucci LF, Jardim EC, Carneiro SR. Occurrence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in patients with chronic periodontitis, aggressive periodontitis, healthy subjects and children with gingivitis in two cities of the state of São Paulo, Brazil. *J Appl Oral Sci.* 2006; 14(3): 153-6.
166. Kulekci G, Leblebicioglu B, Keskin F, Ciftci S, Badur S. Salivary detection of periodontopathic bacteria in periodontally healthy children. *Anaerobe.* 2008; 14(1): 49-54.
167. Hajishengallis G, Darveau RP, Curtis MA. The keystone-pathogen hypothesis. *Nat Rev Microbiol.* 2012; 10(10): 717-25.
168. Umeda M, Contreras A, Chen C, Bakker I, Slots J. The utility of whole saliva to detect the oral presence of periodontopathic bacteria. *J Periodontol.* 1998; 69(7): 828-33.

169. Haririan H, Andrukhov O, Bertl K, Lettner S, Kierstein S, Moritz A, et al. Microbial analysis of subgingival plaque samples compared to that of whole saliva in patients with periodontitis. *J Periodontol.* 2014; 85(6): 819-28.
170. Aebersold R, Mann M. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature.* 2003; 422(6928): 198-207.
171. Ochiai A, Harada K, Hashimoto K, Shibata K, Ishiyama Y, Mitsui T, et al.  $\alpha$ -Amylase is a potential growth inhibitor of *Porphyromonas gingivalis*, a periodontal pathogenic bacterium. *J Periodontal Res.* 2014; 49(1): 62-8.
172. Lindahl P, Aliksson E, Jörnvall H, Björk I. Interaction of the cysteine proteinase inhibitor chicken cystatin with papain. *Biochemistry.* 1988; 27(14): 5074-82.
173. Aguirre A, Testa-Weintraub LA, Banderas JA, Dunford R, Levine MJ. Levels of salivary cystatins in periodontally healthy and diseased older adults. *Arch Oral Biol.* 1992; 37(5): 355-61.
174. Gonçalves Lda R, Soares MR, Nogueira FC, Garcia C, Camisasca DR, Domont G, et al. Comparative proteomic analysis of whole saliva from chronic periodontitis patients. *J Proteomics.* 2010; 73(7): 1334-41.
175. Gonçalves Lda R, Soares MR, Nogueira FC, Garcia CH, Camisasca DR, Domont G, et al. Analysis of the salivary proteome in gingivitis patients. *J Periodontal Res.* 2011; 46(5): 599-606.
176. Huynh AH, Veith PD, McGregor NR, Adams GG, Chen D, Reynolds EC, et al. Gingival crevicular fluid proteomes in health, gingivitis and chronic periodontitis. *J Periodontal Res.* 2015; 50(5): 637-49.
177. Cabras T, Pisano E, Montaldo C, Giuca MR, Iavarone F, Zampino G, et al. Significant modifications of the salivary proteome potentially associated with complications of Down syndrome revealed by top-down proteomics. *Mol Cell Proteomics.* 2013; 12(7): 1844-52.
178. Wu S, Brown JN, Tolić N, Meng D, Liu X, Zhang H, et al. Quantitative analysis of human salivary gland-derived intact proteome using top-down mass spectrometry. *Proteomics.* 2014; 14(10): 1211-22.
179. Holmgren A, Lu J. Thioredoxin and thioredoxin reductase: current research with special reference to human disease. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010; 396(1): 120-4.
180. Aaronson RM, Graven KK, Tucci M, McDonald RJ, Farber HW. Non-neuronal enolase is an endothelial hypoxic stress protein. *J Biol Chem.* 1995; 270(46): 27752-7.

181. Butterfield DA, Sultana R. Redox proteomics identification of oxidatively modified brain proteins in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment: insights into the progression of this dementing disorder. *J Alzheimers Dis.* 2007; 12(1): 61-72.
182. Musunuri S, Kultima K, Richard BC, Ingelsson M, Lannfelt L, Bergquist J, Shevchenko G. Micellar extraction possesses a new advantage for the analysis of Alzheimer's disease brain proteome. *Anal Bioanal Chem.* 2015; 407(4): 1041-57.
183. Campese M, Sun X, Bosch JA, Oppenheim FG, Helmerhorst EJ. Concentration and fate of histatins and acidic proline-rich proteins in the oral environment. *Arch Oral Biol.* 2009; 54(4): 345-53.
184. Thomadaki K, Bosch J, Oppenheim F, Helmerhorst E. The diagnostic potential of salivary protease activities in periodontal health and disease. *Oral Dis.* 2013; 19(8): 781-8.

## APÊNDICE A – Termo de consentimento livre e esclarecido

Por esse instrumento particular declaro, para os devidos fins éticos e legais, que eu, \_\_\_\_\_, (nacionalidade) \_\_\_\_\_, portador do RG nº \_\_\_\_\_, residente à \_\_\_\_\_, na cidade de \_\_\_\_\_, estado de \_\_\_\_\_, responsável por \_\_\_\_\_, entendo que estou autorizando sua participação na pesquisa intitulada “Degradação de histatinas salivares em indivíduos com síndrome de Down e influência antibacteriana sobre periodontopatógenos” sob a responsabilidade da Profa. Dra. Elisa Maria Aparecida Giro.

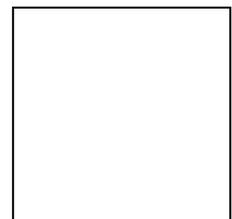
Declaro que tomei ciência e que fui esclarecido de maneira a não restarem quaisquer dúvidas sobre a sua participação no estudo, de acordo com os termos abaixo relacionados:

- A pesquisa tem por objetivo avaliar o processo de degradação (“quebra”) de proteínas presentes na saliva, e a eficácia dessas proteínas contra bactérias que causam a doença periodontal (doença na gengiva).
- Será realizado um exame clínico odontológico usando luz do refletor, sonda e espelho bucal, e, em seguida, será feita a coleta de saliva com o auxílio de um sugador portátil. Esta coleta será realizada no período da manhã (9 – 11 horas) com jejum mínimo de 2 horas, e é um procedimento simples, rápido e não causa dor ou desconforto. Em seguida, a saliva será congelada e, posteriormente será usada para os estudos em laboratório.
- O exame clínico e a coleta de saliva podem causar pequeno desconforto ou a formação de pequena mancha avermelhada no soalho da boca devido ao uso do sugador, que serão prevenidos com o uso de técnicas adequadas. Além disso, risco de contaminação será prevenido com o uso de materiais descartáveis e instrumentais estéreis. Também serão adotados procedimentos de segurança, por meio de uso de luva, máscara, gorro, óculos de proteção e jaleco pela pesquisadora. Mesmo assim, a pesquisadora se responsabilizará por qualquer problema que ocorra durante a realização desses procedimentos, e o participante terá assistência integral garantida se ele sentir algum desconforto, tendo toda liberdade para deixar de participar da pesquisa a qualquer momento, sem qualquer penalidade, perda de benefícios ou repercussão ao atendimento nesta Faculdade.

- O participante estará contribuindo espontaneamente para a realização de uma pesquisa que trará informações para melhor compreensão da doença periodontal (doença da gengiva) resultando em benefícios para a população de uma forma geral.
- Não será oferecida remuneração para participar da pesquisa. Apenas os gastos com alimentação e transporte, caso ocorram, serão ressarcidos pelos pesquisadores quando solicitado pelo participante e/ou responsável.
- O participante receberá orientação de correta escovação dental e outras medidas para a manutenção da saúde bucal e o tratamento odontológico necessário. Mas, mesmo que eu não concorde com a sua participação na pesquisa, se apresentar alguma alteração bucal será encaminhado para a realização do tratamento.
- Os dados e resultados obtidos na pesquisa serão utilizados para fins didáticos e de divulgação em revistas científicas brasileiras ou estrangeiras, porém, a pesquisadora responsável garante que a identidade do participante será mantida em sigilo, assegurando a sua privacidade.
- Em caso de dúvidas poderei contatar a estudante de doutorado Natália Bertolo Domingues ou Professora Dra. Elisa Maria Aparecida Giro no telefone (16) 3301 6336 ou o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Araraquara - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara SP, nos telefones: (16) 3301 6432 ou (16) 3301 6434.
- Estou ciente que receberei uma via assinada e datada deste documento “TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO”. Desta forma, uma vez tendo lido e entendido os esclarecimentos, dato e assino esse termo de consentimento, por estar de pleno acordo com o teor do mesmo.

Araraquara, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_\_\_.

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Responsável pelo Participante



\_\_\_\_\_  
Assinatura da Pesquisadora Responsável

Polegar Direito

## APÊNDICE B – Termo de assentimento

Este documento é destinado as pessoas com síndrome de Down que estão sendo convidadas a participar da pesquisa “DEGRADAÇÃO DE HISTATINAS SALIVARES EM INDIVÍDUOS COM SÍNDROME DE DOWN E INFLUÊNCIA ANTIBACTERIANA SOBRE PERIODONTOPATÓGENOS”.

- Nosso nome é Natália Bertolo Domingues e Elisa Maria Aparecida Giro e estudamos a saliva das pessoas.
- Queremos saber como é a sua saliva.
- O seus pais ou responsáveis sabem que estamos pedindo o apoio de você. Caso você participe da pesquisa, eles também terão que concordar, assinando uma declaração. Mas é importante saber que mesmo se eles concordarem que você participe, você não é obrigado.
- Nós só vamos examinar a sua boca e pegar um pouco da sua saliva se você quiser!
- O exame e a coleta da saliva serão realizados na Faculdade de Odontologia de Araraquara-FOAR e não causa nenhum machucado!
- Vamos pegar a sua saliva com um canudinho e não vai doer!
- Não vamos usar nenhum material sujo!
- Só os seus pais saberão o que nós observarmos na sua boca. Eles vão ter meu telefone para que vocês falem comigo se tiverem alguma dúvida ou quiserem algum tratamento para os dentes. Caso vocês queiram o tratamento, nós vamos atender sem cobrar nada.
- Pode avisar seus pais ou qualquer outra pessoa que você confie se alguém não te tratar bem !!!



Você deixa que a sua boca seja examinada (foto do lado esquerdo) e sua saliva seja coletada (foto do lado direito), como mostrado nas fotos acima? Marque a carinha feliz se você quiser ajudar e a carinha triste se você não quiser ajudar.



Araraquara, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_\_\_.

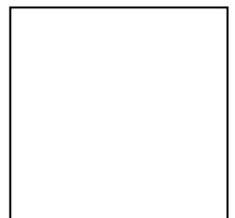
Participante: \_\_\_\_\_

Pessoa que obteve o consentimento: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Responsável pela Pesquisa: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_



Polegar Direito do Participante

**APÊNDICE C – Lista das proteínas exclusivas identificadas por espectrometria de massas na abordagem de digestão *in-solution* no grupo NSsDP**

<b>Nome da Proteína</b>
Mucin-5AC
Tensin-1 (Fragment)
cDNA FLJ56510, highly similar to Tumor suppressor p53-binding protein 1
Alternative protein ANKRD11
HSPC109
Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 13-like
MKL/myocardin-like protein 1
cDNA FLJ39529
Protein TANC1
Collagen alpha-1(XXVII) chain (Fragment)
Supervillin (Fragment)
Catenin delta-2
GTPase-activating Rap/Ran-GAP domain-like protein 3
Telomerase protein component 1
cDNA FLJ38861
Ankyrin repeat domain-containing protein 17 (Fragment)
Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 3
Late cornified envelope protein 1A
Ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat protein Y-linked transcript variant 29
Mineralocorticoid receptor
RNA exonuclease 1 homolog
Protein enabled homolog
Immunoglobulin heavy constant alpha 1
Glucocorticoid modulatory element-binding protein 2
Late cornified envelope protein 1C
Ras-responsive element-binding protein 1
Integrin beta
Plakophilin 1 (Ectodermal dysplasia/skin fragility syndrome), isoform CRA_a
DNA topoisomerase 2-alpha
IgGFc-binding protein
InaD-like protein
G protein-regulated inducer of neurite outgrowth 1
Neurobeachin
Parathyroid hormone-related protein
Transmembrane protein 40
Uncharacterized protein FLJ46757
Src homology 2 domain containing E
Ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat protein Y-linked transcript variant 241
Ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat protein Y-linked transcript variant 59
SRC kinase signaling inhibitor 1
Ataxin-7-like protein 1 (Fragment)
DENN domain-containing protein 4C (Fragment)
Glutamine and serine-rich protein 1
cDNA FLJ55500, highly similar to B-cell receptor CD22
Down syndrome cell adhesion molecule like 1, isoform CRA_a
Protein FAM57A (Fragment)
A-kinase anchor protein 11
Histone-lysine N-methyltransferase SETD1B
Ets transcription factor TEL-2b variant (Fragment)
F-box only protein 38
cDNA FLJ57828
Calpastatin, isoform CRA_a

cDNA FLJ55596
Zinc finger protein 385D
Alternative protein WDFY1
Synaptogyrin-2
E3 ubiquitin-protein ligase HECW2
Uncharacterized protein KIAA1522
cDNA FLJ50636
CUB and Sushi multiple domains 1 variant (Fragment)
Tubulin polyglutamylase complex subunit 2
Treslin
E3 ubiquitin-protein ligase RNF169
FYVE, RhoGEF and PH domain-containing protein 6
cDNA, FLJ94213
cDNA FLJ46886
cDNA FLJ38624
cDNA FLJ58249
Rho GTPase-activating protein 11A
PLEKHG1 protein (Fragment)
MAGEL2 protein (Fragment)
mRNA cap guanine-N7 methyltransferase
Xeroderma pigmentosum, complementation group C, isoform CRA_a
Histone acetyltransferase KAT7
cDNA FLJ52602
MAP3K6 protein
Homeobox protein MOX-1
cDNA FLJ53524
Protein unc-13 homolog A
SASH1 protein (Fragment)
Telomere zinc finger-associated protein (Fragment)
cDNA, FLJ96239
Teneurin-3
Ribosomal L1 domain-containing protein 1 (Fragment)
DNA-dependent protein kinase catalytic subunit
Kinesin-like protein KIF21A (Fragment)
Membrane-associated guanylate kinase, WW and PDZ domain-containing protein 1 (Fragment)
Microtubule-associated protein 2
FP17780
cDNA FLJ57432
Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2
RING finger protein 219
Putative uncharacterized protein DKFZp686E13109 (Fragment)
Nebulin
Dentin sialophosphoprotein variant G (Fragment)
Roquin-2
Nuclear receptor corepressor 1
Ral guanine nucleotide dissociation stimulator-like 2, isoform CRA_d
Polycystic kidney disease 1-like 2, isoform CRA_a
cDNA FLJ46776
Mitogen-activated protein kinase 8 interacting protein 1
ZBTB22
RNA binding motif protein 7
PTB domain-containing engulfment adapter protein 1 (Fragment)
Protein FAM117B
cDNA FLJ52804
cDNA FLJ54004
U2 snRNP-associated SURP motif-containing protein
Probable phospholipid-transporting ATPase IH
Phosphatase and actin regulator 4

Serine/threonine-protein kinase D1
Nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic 1
cDNA FLJ53320, highly similar to Disks large-associated protein 1
Protein shisa-2 homolog
E3 ubiquitin-protein ligase HERC2
cDNA FLJ30689
Fibronectin type III domain-containing protein 3B
Protein Shroom3
Podocan-like protein 1
Leucine zipper protein 1, isoform CRA_a
cDNA, FLJ95843
Olfactory receptor (Fragment)
Pleckstrin homology-like domain, family B, member 1, isoform CRA_c
Midnolin
Major capsid protein
ENTH domain-containing protein 1
Protein SOGA1
Olfactory receptor
cDNA FLJ50530
Netrin receptor DCC
GRB2-associated-binding protein 2
KIR2DS5 (Fragment)
Alternative protein RNF222
BTB/POZ domain-containing protein 10
Trichohyalin-like protein 1
cDNA FLJ59591
Zinc finger BED domain-containing protein 4
TATA box-binding protein-associated factor RNA polymerase I subunit C
cDNA FLJ11413 fis, clone HEMBA1000908
Misshapen-like kinase 1
Kallikrein 6 (Neurosin, zyme), isoform CRA_c (Fragment)
cDNA FLJ31479
Lim-homeobox transcription factor LHX3
Prolow-density lipoprotein receptor-related protein 1
Leukocyte immunoglobulin-like receptor subfamily B member 4
cDNA FLJ61649
C2 domain-containing protein 3
L1 cell adhesion molecule (Fragment)
Protein ZGRF1
Histone-lysine N-methyltransferase 2D
E3 ubiquitin-protein ligase DTX4
cDNA FLJ61741, highly similar to HIRA protein
Cadherin EGF LAG seven-pass G-type receptor 1
MUC19 variant 12 (Fragment)
Erbin
Probable G-protein coupled receptor 75
Zinc finger protein 687
Unc-51-like kinase 2 (C. elegans), isoform CRA_a
Putative uncharacterized protein DKFZp686J0330
JMJD1C protein
Arginine-glutamic acid dipeptide repeats protein
Lysine-specific demethylase 3B
Peripheral plasma membrane protein CASK
GPALPP motifs-containing protein 1
Paired box protein Pax-5 (Fragment)
Elastase 3A, pancreatic
Podocalyxin
RAB6A-GEF complex partner protein 1 (Fragment)

ZFH2 protein
Centromere protein F
Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal
GRB2-associated and regulator of MAPK protein 2
cDNA, FLJ79461, highly similar to Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator
Kinase D-interacting substrate of 220 kDa
Runt-related transcription factor 2
Zinc finger homeobox protein 3
Neurogenic locus notch homolog protein 2
Protein PRRC2C
Alpha-tectorin
Cysteine/serine-rich nuclear protein 3 (Fragment)
cDNA FLJ44973
Chloride channel CLIC-like 1, isoform CRA_a
Interleukin-1 receptor accessory protein-like 1
AT-hook DNA-binding motif-containing protein 1
cDNA FLJ54385
Fas (TNFRSF6) binding factor 1
Proline and serine-rich protein 3 (Fragment)
Myb-related protein B
cDNA FLJ39512
YLP motif-containing protein 1 (Fragment)
Bromodomain and PHD finger-containing protein 3
Zinc finger protein 554
EPH receptor B4, isoform CRA_b
Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 17-like protein 5
PKD1 (Fragment)
NK-tumor recognition protein
Neogenin (Fragment)
cDNA FLJ56111
Synaptosomal-associated protein 47
Nuclear-interacting partner of ALK
Amyloid-like protein 1
Rho GTPase-activating protein 32
MHC class I antigen (Fragment)
Dynein, axonemal, heavy polypeptide 11, isoform CRA_c
Putative uncharacterized protein DKFZp686B2325 (Fragment)
Ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat protein Y-linked transcript variant 22
Transcription factor TFIIIB component B" homolog
cDNA, FLJ79056 (Fragment)
ATP-binding cassette sub-family A member 13
Zinc finger, AN1-type domain 2B, isoform CRA_c
RAN binding protein 3 transcript variant a
DNA-binding protein RFX7
IQCJ-SCHIP1 readthrough (Fragment)
Protein phosphatase Slingshot homolog 2
Myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia translocated to, 10 isoform a variant (Fragment)
Protein SMG8 (Fragment)
Junctional protein associated with coronary artery disease
Protein GREB1
Rho GTPase-activating protein 23
cDNA FLJ52445
Myosin phosphatase Rho-interacting protein (Fragment)
VWA7
Homeobox protein cut-like 2
Rap guanine nucleotide exchange factor 1
Protein phosphatase 1 regulatory subunit 3A
Uncharacterized protein C11orf24

Olfactory receptor 10K1
FACT complex subunit SSRP1
Gamma-aminobutyric acid receptor subunit alpha-4
Transmembrane protein 200C
Neuronal PAS domain protein 3 isoform B
Complement C5
Disks large homolog 1
RAF proto-oncogene serine/threonine-protein kinase (Fragment)
DPCR1
Neuron navigator 2
Putative uncharacterized protein CAD (Fragment)
ZFAT protein (Fragment)
Triple functional domain (PTPRF interacting), isoform CRA_a
cDNA FLJ44733
SRY-box 9 (Fragment)
Protocadherin Fat 4
Histone-lysine N-methyltransferase (Fragment)
DNA helicase B
Disrupted in schizophrenia 1 isoform 24
C-type lectin domain family 14 member A
cDNA FLJ37510
Putative uncharacterized protein DKFZp779A1451 (Fragment)
Speedy protein A
Probable helicase senataxin
Leucine-rich repeat flightless-interacting protein 2
Holliday junction recognition protein
Breast cancer type 1 susceptibility protein (Fragment)
Cation-transporting ATPase
cDNA FLJ60378
Endomucin variant (Fragment)
cDNA FLJ52668
Nuclear envelope pore membrane protein POM 121C
Transmembrane and coiled-coil domains protein 1
AF4/FMR2 family member 3
Siglec-16 (Fragment)
Little elongation complex subunit 1
Nucleolar and coiled-body phosphoprotein 1 (Fragment)
cDNA FLJ57327
B-cell CLL/lymphoma 9 protein
Protein PROCA1
Protein Wiz
Putative uncharacterized protein pp9003
Nedd4 binding protein 2
Zinc finger MYND domain-containing protein 15
Late cornified envelope protein 3A
cDNA FLJ60302, highly similar to Neurocan core protein
TBC1 domain family member 9
RNPEPL1 protein
TACR1 protein (Fragment)
Alternative protein JMJD4
Beta globin chain (Fragment)
Xin actin-binding repeat-containing protein 2
Cystatin-SA
Helicase (Fragment)
Regulating synaptic membrane exocytosis protein 2 (Fragment)
Microtubule-associated protein 1B, isoform CRA_b
cDNA FLJ25822 fis, clone TST07893
Endogenous retrovirus group K member 19 Env polyprotein

SMC5-SMC6 complex localization factor protein 2
Pleckstrin homology-like domain family B member 2 (Fragment)
Activating transcription factor 7-interacting protein 2
Nuclear fragile X mental retardation-interacting protein 2
Histone-lysine N-methyltransferase SETD2
Enhancer of mRNA-decapping protein 4
Gag-Pro-Pol-Env protein
Coronin
Complement C1q tumor necrosis factor-related protein 2
Helicase SRCAP
Interleukin-15 receptor subunit alpha (Fragment)
Protocadherin alpha subfamily C, 2
Ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat protein Y-linked transcript variant 6
Hypoxia-inducible factor 3-alpha
cDNA FLJ50948, highly similar to Synaptojanin-1 (EC 3.1.3.36)
HLA class I histocompatibility antigen, A-30 alpha chain
cDNA FLJ36998
Transcription initiation factor TFIID subunit 6
cDNA FLJ76153
cDNA FLJ55728
Ubiquitin-associated protein 1 (Fragment)
Serine/threonine-protein kinase ULK1
Tyrosine-protein kinase ABL1
Collagen alpha-1(XII) chain
Protein NDNF
CMT1A duplicated region transcript 1 protein
cDNA FLJ75589
G-protein-coupled receptor 34 splice variant
cDNA FLJ14826
NKAP-like protein
ZBTB10 protein (Fragment)
Nck-associated protein 1
t-SNARE domain-containing protein 1
cDNA FLJ77548
cDNA FLJ20004 fis, clone ADKA02391
T-cell receptor beta variable 15 (Fragment)
Zinc finger protein with KRAB and SCAN domains 7
Similar to potassium voltage-gated channel, KQT-like subfamily, member 1 (Fragment)
Voltage-dependent T-type calcium channel subunit alpha-1H
cDNA FLJ75500
BRCA1-associated ATM activator 1
Serine/threonine-protein kinase greatwall (Fragment)
E3 ubiquitin-protein ligase TRAF7
cDNA FLJ51603
Metallothionein-3
Protocadherin-16
Synaptotagmin-like protein 5
Coiled-coil domain-containing protein 66 (Fragment)
Ankyrin repeat and MYND domain-containing protein 1
Fibronectin (Fragment)
FH1/FH2 domain-containing protein 3
CD300Hs
Myotilin
Lamin-B2
Acid-sensing ion channel 5 (Fragment)
Transmembrane channel-like protein
Seven transmembrane helix receptor
Synaptotagmin-10

Glutathione S-transferase P
Tuberin OS=Homo sapiens
Rho GTPase activating protein 9, isoform CRA_a
Agurin
Cytoplasmic dynein 1 heavy chain 1
cDNA FLJ75279
cDNA FLJ53288
Storkhead-box protein 1
Protein JBTS17
Ribosomal oxygenase 2
Helicase-like transcription factor (Fragment)
cDNA FLJ58741
Histone deacetylase
Protein NRDE2 homolog
cDNA FLJ76940
Tumor necrosis factor receptor superfamily member 11A
CXXC-type zinc finger protein 5 (Fragment)
Uncharacterized protein C15orf39
Sodium/hydrogen exchanger
Zinc finger protein 839
SKI family transcriptional corepressor 2
IQ motif and SEC7 domain-containing protein 1
Putative POM121-like protein 1-like
KIAA1244
Adhesion G protein-coupled receptor L2 (Fragment)
Eukaryotic translation initiation factor 5B
Uncharacterized protein C3orf18
cDNA FLJ59806, highly similar to Histone deacetylase 4
Basic helix-loop-helix domain-containing protein USF3
cDNA FLJ50057, weakly similar to LIM domain only protein 7 (Fragment)
Abl interactor 2 (Fragment)
Calcium-transporting ATPase type 2C member 1
Cat eye syndrome critical region protein 2
EMI domain-containing protein 1
Poly (ADP-ribose) glycohydrolase
Putative protein FAM47C
G-protein coupled receptor 182
cDNA FLJ50409, highly similar to Transforming acidic coiled-coil-containing protein 1
Potassium voltage-gated channel, KQT-like subfamily, member 2, isoform CRA_j
FH2 domain-containing protein 1
Major facilitator superfamily domain-containing protein 10
Serine/threonine-protein kinase WNK2
Sentrin-specific protease 7
Sec1 family domain-containing protein 1 (Fragment)
Neurogenic locus notch homolog protein 1
cDNA FLJ52433
Late cornified envelope protein 3E
cDNA FLJ51029
Cyclic AMP-responsive element-binding protein 1 (Fragment)
Fibrocystin
Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 12
Zinc finger with UFM1-specific peptidase domain protein
Transmembrane protein 94 (Fragment)
Keratin, type I cuticular Ha8
Sperm-specific antigen 2
Reticulon (Fragment)
Perilipin
GREB1-like protein

Teashirt homolog 2
U30
Transcriptional regulator
Phosphotriesterase-related protein
Glycophorin-B
Myeloid leukemia factor 2 (Fragment)
Protein YIPF2 (Fragment)
Dendritic cell nuclear protein 1
Signal peptide, CUB and EGF-like domain-containing protein 2
F-box/LRR-repeat protein 7
Ephrin type-A receptor 10 (Fragment)
Cystatin-D
Down syndrome cell adhesion molecule
BRCA1-associated RING domain protein 1
Putative uncharacterized protein DKFZp686I04196 (Fragment)
Inner centromere protein
Cytochrome P450 2W1 (Fragment)
Dystrotelin
Trinucleotide repeat-containing gene 18 protein
MutS protein homolog 4
Brain-enriched guanylate kinase-associated protein
UBX domain-containing protein 11
Vacuolar protein sorting 13A (Yeast), isoform CRA_a
Uncharacterized protein C1orf106
Adenylate cyclase type 6
cDNA, FLJ94049
Serine/threonine-protein kinase ATR
Sushi, nidogen and EGF-like domain-containing protein 1
WD repeat, SAM and U-box domain-containing protein 1 OS=Homo sapiens GN=WDSUB1 PE=1 SV=2 - [B8ZZF2_HUMAN]
Unconventional myosin-IXa (Fragment)
SLIT-ROBO Rho GTPase activating protein 2 (Fragment)
Zinc finger protein 609
Bromodomain adjacent to zinc finger domain, 2A, isoform CRA_a
Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 43 (Fragment)
Ankyrin repeat domain-containing protein 30B
Zinc finger CCCH domain-containing protein 6
BRD4-interacting chromatin remodelling complex-associated protein
cDNA FLJ59350
Putative uncharacterized protein DKFZp686D1070 (Fragment)
Olfactory receptor 6C65
CLIP1 protein (Fragment)
PHD and RING finger domain-containing protein 1
Putative uncharacterized protein DKFZp547A023 (Fragment)
Synaptotagmin-like protein 2
cDNA FLJ60083
Acyltransferase like 2, isoform CRA_a
Replication protein A 70 kDa DNA-binding subunit
cDNA FLJ46074
Zinc finger MYND domain-containing protein 12
FERM, RhoGEF and pleckstrin domain-containing protein 2 (Fragment)
Protein-associating with the carboxyl-terminal domain of ezrin (Fragment)
PRUNE2
Kinesin-like protein KIF20A
Protocadherin gamma subfamily B, 1
Thyrotropin receptor
OR14J1
Taxilin beta, isoform CRA_a

cDNA FLJ52336
cDNA FLJ13312
cDNA, FLJ94385
Polypyrimidine tract-binding protein 3 (Fragment)
Cadherin EGF LAG seven-pass G-type receptor 2
PAX4 protein
Transcription factor 4
Putative uncharacterized protein UNC5C (Fragment)
Thyroid adenoma-associated protein
Multiple epidermal growth factor-like domains protein 6
Protein regulator of cytokinesis 1, isoform CRA_e
Vitamin D-binding protein
MANSC domain-containing protein 4
cDNA FLJ53742
cDNA FLJ60584
Unconventional myosin-IId
SCY1-like protein 2
cDNA FLJ51208
cDNA FLJ45949
Coronin-2B
cDNA FLJ76782
HRV Fab 027-VL (Fragment)
cDNA FLJ10083
cDNA FLJ50848
OR52E1
BLOC-1-related complex subunit 6
Testis secretory sperm-binding protein Li 209a
Golgi-associated olfactory signaling regulator
MHC class I antigen
Basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan core protein variant (Fragment)
cDNA FLJ54337
Transcriptional repressor p66-alpha
Signal-induced proliferation-associated 1 like 3
TSC22 domain family protein 1
T-box 3 (Ulnar mammary syndrome), isoform CRA_a
Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 1 (Fragment)
Nephrin
cDNA FLJ78648
LOC100170229 protein (Fragment)
Rho guanine nucleotide exchange factor 6
Tau-tubulin kinase 1
Probable ribonuclease ZC3H12B
Putative uncharacterized protein GRB10 (Fragment)
PDZ domain-containing protein 2
cDNA FLJ59297
Transcriptional regulator ATRX
Cyclin-dependent kinase inhibitor 3
Vasopressin V2 receptor
Centrosomal protein of 104 kDa
Oxysterol-binding protein-related protein 11
Pericentrin
Ankyrin-1
cDNA FLJ13167
Phosphoinositide 3-kinase adapter protein 1
Signal peptide, CUB and EGF-like domain-containing protein 1
Sperm-associated antigen 17
Protocadherin Fat 2
Breast carcinoma amplified sequence 3

MYO3B protein
cDNA FLJ61052
Histone-lysine N-methyltransferase 2C (Fragment)
CGNL1 protein (Fragment)
cDNA FLJ43580
Envoplakin, isoform CRA_a
Sacsin
Lipocalin-1
Joubertin (Fragment)
Vacuolar protein sorting-associated protein 13C
Histone-lysine N-methyltransferase, H3 lysine-79-specific (Fragment)
Rootletin
cDNA, FLJ95492
cDNA FLJ60072
GRIA4 protein (Fragment)
Protocadherin beta-1
Transmembrane protein 132B
YY1-associated protein 1
Retinitis pigmentosa 1 (Fragment)
2,4-dienoyl-CoA reductase, mitochondrial (Fragment)
Myelin gene expression factor 2
Seizure 6-like protein 2
OR6B2
Double-strand break repair protein MRE11
NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 2
Cytochrome P450, family 46 variant (Fragment)
cDNA FLJ40857
cDNA FLJ46459
Usher syndrome 1C binding protein 1, isoform CRA_a
RNA-specific adenosine deaminase
Myosin Va (Fragment)
U60/66
Rho guanine nucleotide exchange factor 17
Protein NLRC5
BV13S1J2.2 protein (Fragment)
Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 34
E3 ubiquitin-protein ligase NEDD4
Uncharacterized protein C19orf47
Sister chromatid cohesion protein PDS5 homolog B (Fragment)
Transmembrane channel-like protein 3
Proline-rich protein 12
cDNA FLJ56590
Protein sidekick-2
Exophilin-5 (Fragment)
Armadillo repeat-containing X-linked protein 4
Ligand-dependent nuclear receptor-interacting factor 1
FYB protein (Fragment)
Dual-specificity protein phosphatase 13 isoform B (Fragment)
Inactive ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 54 (Fragment)
Dihydropyrimidinase-related protein 3 (Fragment)
B-cell CLL/lymphoma 6 member B protein
cDNA FLJ38125
Brain-specific angiogenesis inhibitor 1-associated protein 2-like protein 2
cDNA FLJ58726 OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [B4DK21_HUMAN]
RcCTAGE5 (Fragment)
HCG2038564 (Fragment)
VPS10 domain-containing receptor SorCS2
Adenosylhomocysteinase 3 (Fragment)

Forkhead box protein K2 (Fragment)
Alternative protein KIAA2013
HMG domain-containing protein 3
Polycystin-1 (Fragment)
cDNA FLJ51386
cDNA FLJ52882
Vitrin
Protein CBFA2T3 (Fragment)
Signal recognition particle 14 kDa protein
Membrane-associated phosphatidylinositol transfer protein 2
P protein (Fragment)
Serine/threonine-protein kinase N1
Terminal uridylyltransferase 4 (Fragment)
Sphingosine-1-phosphate lyase 1
Adhesion G protein-coupled receptor L3
Polyribonucleotide nucleotidyltransferase 1, mitochondrial
Glycine dehydrogenase (decarboxylating), mitochondrial
PWWP domain-containing protein 2B
Ras association domain-containing protein 10
WD repeat-containing protein 25
Dedicator of cytokinesis protein 10
Putative uncharacterized protein DKFZp586C1419 (Fragment)
cDNA FLJ56831
U2
Transmembrane protein 245
Beta-1,4 N-acetylgalactosaminyltransferase
Protein FAM110B
Myb-related protein A
LOC401367
Disks large-associated protein 2 (Fragment)
Ring finger and WD repeat domain 2 isoform H (Fragment)
Kinesin-like protein KIF13A
Obscurin-like protein 1
NADP-dependent oxidoreductase domain-containing protein 1
Short-chain acyl-CoA dehydrogenase
Sulfotransferase family cytosolic 2B member 1
cDNA FLJ30074
cDNA FLJ52675
Limbic system-associated membrane protein (Fragment)
Keratin-associated protein 16-1
HPMS6 protein (Fragment)
Laminin alpha 3b chain (Fragment)
RAS protein activator like-3
DDB1- and CUL4-associated factor 13
CASK interacting protein 1, isoform CRA_a
MGC13008 protein
KIAA0528 protein
Ribonuclease P protein subunit p25
Spermatid perinuclear RNA binding protein isoform 2 (Fragment)
Kelch-like protein 22
Chloride channel protein
GRB2-associated-binding protein 1
RNA pseudouridylate synthase domain-containing protein 1
Erythrocyte band 7 integral membrane protein
Leucine-rich repeat and IQ domain-containing protein 1
Zinc finger protein 385C
TACC2 protein
COP9 signalosome complex subunit 5

GPI ethanolamine phosphate transferase 2
Fumarate hydratase, mitochondrial
cDNA FLJ38970
Unconventional myosin-VI
Signal-induced proliferation-associated 1-like protein 2
Ligand-dependent corepressor
Vestigial-like 4 (Fragment)
Semaphorin-5B
HCG2019817, isoform CRA_d
OAZ1 protein
Acetyl-CoA carboxylase 2 variant (Fragment)
Thrombospondin type-1 domain-containing protein 4
KCNK4 protein (Fragment)
cDNA FLJ23920 fis, clone COL02027
cDNA FLJ40166
Transformation/transcription domain-associated protein variant (Fragment)
cDNA FLJ61174
cDNA FLJ59641
DNA cross-link repair 1A protein
ZNF268 protein
Gamma-tubulin complex component
Disks large homolog 2 (Fragment)
Putative uncharacterized protein ENSP00000383309
cDNA FLJ26930 fis, clone RCT05832
Protein shisa-7 (Fragment)
Germinal-center associated nuclear protein
cDNA FLJ77685
Neuronal tyrosine-phosphorylated phosphoinositide-3-kinase adapter 1
Palmitoyltransferase ZDHHC5 (Fragment)
Zinc fingers and homeoboxes protein 1
Probable ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase MINDY-4
Metabotropic glutamate receptor 6
Uncharacterized protein C2orf54
cDNA FLJ37346
Zinc finger SWIM domain-containing protein 8 (Fragment)
cDNA FLJ52931
Receptor tyrosine-protein kinase erbB-4
cDNA FLJ60391
GSG2 protein (Fragment)
Probable ATP-dependent RNA helicase DDX4 (Fragment)
Ceramide glucosyltransferase
cDNA FLJ53239
Maestro heat-like repeat family member 5
WUGSC:H_248015.1 protein (Fragment)
Tetratricopeptide repeat protein 38 (Fragment)
cDNA FLJ61601
cDNA FLJ56472
ZNF644 protein (Fragment)
Glycoprotein
Ganglioside-induced differentiation-associated protein 2
Pol protein
Bloom syndrome protein
Putative metallothionein MT1DP
STX16-NPEPL1 readthrough (NMD candidate)
Pannexin
N-acetylated-alpha-linked acidic dipeptidase-like protein
Tyrosine-protein kinase BAZ1B
cDNA FLJ59769

Cadherin 5, type 2 preproprotein variant (Fragment)
cDNA FLJ56701
Diencephalon/mesencephalon homeobox protein 1
Arachidonate 12-lipoxygenase, 12R-type
cDNA FLJ54284
Cell division cycle and apoptosis regulator protein 1 (Fragment)
PP10881
Protein ABHD18

**APÊNDICE D – Lista das proteínas exclusivas identificadas por espectrometria de massas na abordagem de digestão *in-solution* no grupo NScDP**

<b>Nome da Proteína</b>
Anti-RhD monoclonal T125 kappa light chain
Dedicator of cytokinesis protein 6 (Fragment)
Bromodomain and WD repeat-containing protein 1
SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily E member 1 (Fragment)
cGMP-inhibited 3',5'-cyclic phosphodiesterase A
Cystatin-SN OS=Homo sapiens GN=CST1 PE=1 SV=3 - [CYTN_HUMAN]
cDNA FLJ32792
Nuclear receptor coactivator 2
Sorting nexin-16 (Fragment)
Ribosomal RNA processing protein 1 homolog B
KIAA0232
Glycophorin Mz II-IV (Fragment)
CIC-FOXO4 fusion protein
Putative uncharacterized protein DKFZp686E2262 (Fragment)
MAX gene-associated protein
Period circadian protein homolog 1
IGL@ protein
A kinase (PRKA) anchor protein 6, isoform CRA_b
HCG1985901
Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 13
CREB/ATF bZIP transcription factor
Zinc finger protein 608, isoform CRA_b
Aspartyl/asparaginyl beta-hydroxylase
Nuclear receptor coactivator 1
Pleckstrin homology domain-containing family M member 1
Alpha heavy chain (Fragment)
Dynein heavy chain 5, axonemal
Trinucleotide repeat-containing gene 6A protein
Dedicator of cytokinesis protein 2
SprT-like domain-containing protein Spartan
cDNA FLJ50838
Oviductin
cDNA FLJ45733
Late cornified envelope protein 1E
CEP295 N-terminal-like protein
Myomegalin
Fibronectin type III domain-containing protein 7
cDNA FLJ16099
Protein Shroom2
Putative uncharacterized protein DKFZp686J11235 (Fragment)
Late cornified envelope protein 1D
cDNA FLJ46121
Complement component 1, q subcomponent, receptor 1 variant (Fragment)
WWC3 protein (Fragment)
PRR14 protein (Fragment)
cDNA FLJ57286
Mitogen-activated protein kinase kinase 21
C2CD2L protein
TP53-binding protein 1 (Fragment)
FERM domain-containing protein 4A
Protein FAM193A
Hemoglobin subunit alpha

TEA domain family member 4 isoform 2
Phosphodiesterase
Phosphatase and actin regulator
cDNA FLJ53253
cDNA FLJ76742
cDNA FLJ75402
cDNA FLJ77849
Bridging integrator 2 (Fragment)
Transcription initiation factor TFIID subunit 9 (Fragment)
Chromobox protein homolog 2
Anti-HER3 scFv (Fragment)
cDNA FLJ45044
cDNA FLJ46261
Phospholipid transfer protein C2CD2L
Neurofilament heavy polypeptide
BCL11a-M (Fragment)
APC11 anaphase promoting complex subunit 11 homolog (Yeast), isoform CRA_b
DNA polymerase theta
Deleted in malignant brain tumors 1 protein
Parathyroid hormone/parathyroid hormone-related peptide receptor
Transforming acidic coiled-coil-containing protein 1 (Fragment)
1-phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate phosphodiesterase eta-1
Protection of telomeres protein 1
Deafness, autosomal recessive 31, isoform CRA_b
Zinc finger protein 407
Forkhead box protein P4
Rho GTPase-activating protein 42 (Fragment)
Coiled-coil domain-containing protein 189 (Fragment)
Kinesin-like protein KIF26A
Protein monoglycylase TTLL8 (Fragment)
cDNA FLJ78504
Breast and ovarian cancer susceptibility protein (Fragment)
Protein TANC2
Centrosomal protein 170kDa
cDNA FLJ50076
Sphingomyelin phosphodiesterase 3 (Fragment)
cDNA FLJ45846
BRCA2-interacting transcriptional repressor EMSY
Glyceronephosphate O-acyltransferase variant (Fragment)
Protein dopey-2
Tether-containing UBX domain for GLUT4 (Fragment)
ADAM metallopeptidase domain 22
Uncharacterized protein C2orf71
Immunoglobulin-like domain-containing receptor 2
Voltage-dependent T-type calcium channel subunit alpha-1G
SEC14-like 1 (S. cerevisiae), isoform CRA_a
Zinc finger MYM-type protein 3
Pleckstrin homology domain-containing family H member 2
PDZ and LIM domain protein 2 (Fragment)
Calcium-transporting ATPase
Melanoma-associated antigen B6
Chloride channel protein 2 (Fragment)
cDNA FLJ40508
5'-AMP-activated protein kinase subunit gamma-3
Keratin, type II cytoskeletal 71
Leucine-rich repeat kinase 2
Protein PRRC2B
Uncharacterized protein KIAA1683

Kinesin-like protein KIF21B
G-protein coupled receptor family C group 6 member A
cDNA FLJ78751
Similar to MGC76216 protein
Microtubule-associated tumor suppressor candidate 2
cDNA FLJ61741
cDNA FLJ16204
Glycophorin A (Fragment)
Alternative protein BCAN
Transmembrane protein 39B (Fragment)
Heterochromatin protein 1-binding protein 3
cDNA FLJ78647
Ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat protein Y-linked transcript variant 252
Protein unc-80 homolog
Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 21, isoform CRA_a
Zinc finger protein 384 (Fragment)
WAS/WASL-interacting protein family member 2
Glutamyl-tRNA synthetase (Fragment)
Kinesin-like protein KIF13B
Adenylate cyclase type 9 (Fragment)
Xin actin-binding repeat-containing protein 1
Transmembrane protein 201 (Fragment)
Phosphoinositide phospholipase C (Fragment)
Pro-neuregulin-1, membrane-bound isoform (Fragment)
cDNA FLJ59425, highly similar to SH3-domain kinase-binding protein 1
cDNA FLJ44017
cDNA FLJ44592
HERV-H_2q24.3 provirus ancestral Env polyprotein
cDNA FLJ44557
Testis-expressed protein 44
Ubiquitin specific peptidase 4 (Proto-oncogene)
cDNA, FLJ93024
Tensin like C1 domain containing phosphatase (Tensin 2), isoform CRA_a
cDNA FLJ61066
Microtubule-associated serine/threonine-protein kinase 1
Insulin-like growth factor 2 receptor variant (Fragment)
Histone-lysine N-methyltransferase SETD2 (Fragment)
Synaptojanin 1 (Fragment)
Neuroblastoma breakpoint family member 1
Contactin associated protein-like 2 isoform D (Fragment)
Kelch-like protein 13
5-methylcytosine rRNA methyltransferase NSUN4 (Fragment)
WNK1 protein (Fragment)
cDNA FLJ50057
Tyrosine-protein kinase
cDNA FLJ54038
cDNA FLJ33592
RIMS-binding protein 3B
DNA helicase
cDNA FLJ44721
Gastrin/cholecystokinin type B receptor
Zinc finger protein ZNF-U69274 variant (Fragment)
Nucleolysin TIA-1 isoform p40
cDNA FLJ42347
G protein-coupled receptor 116, isoform CRA_a
Tenascin
FERM and PDZ domain-containing protein 3 (Fragment)
Treacle protein

cDNA FLJ54084
Integrin beta-7
Voltage-dependent L-type calcium channel subunit beta-4
ATP synthase mitochondrial F1 complex assembly factor 2
DMD protein
Trinucleotide repeat-containing gene 6B protein (Fragment)
Low affinity sodium-glucose cotransporter
cDNA FLJ76119
Zinc finger, FYVE domain containing 16, isoform CRA_a
Ankyrin repeat domain-containing protein 33B
DEP domain-containing mTOR-interacting protein
cDNA FLJ41838
cDNA, FLJ93207
Cell division control protein 45 homolog
Regulatory solute carrier protein family 1 member 1
Rearranged L-myc fusion sequence variant (Fragment)
Putative uncharacterized protein DKFZp761O2023 (Fragment)
Proline-rich transmembrane protein 4
cDNA FLJ30616
Ras-specific guanine nucleotide-releasing factor RalGPS1 (Fragment)
Piwi-like protein 4
AF4/FMR2 family member 1 (Fragment)
Metabotropic glutamate receptor 5 variant F
Rab11 family-interacting protein 1
Transmembrane protein 254
Ankyrin repeat and SAM domain-containing protein 1A
Putative RNA-binding protein 15
WD repeat-containing protein 76
Terminal uridylyl transferase 1 U6 snRNA-specific isoform 1 (Fragment)
Inositol polyphosphate-4-phosphatase, type I, 107kDa, isoform CRA_c
UACA protein
La-related protein 6
Nanos homolog 3
TPR and ankyrin repeat-containing protein 1
cDNA FLJ57242
Staphylococcal nuclease domain-containing protein 1
cDNA FLJ57216
GAS2-like protein 1
cDNA FLJ51442
DNA-binding protein RFX2
cDNA FLJ75211
Mucin (Fragment)
GPR110 protein (Fragment)
Laminin subunit gamma-3
SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily A-like protein 1
Atrophin-1
Uncharacterized protein C10orf71
WD repeat-containing protein 63
Calmodulin binding transcription activator 2
Sialic acid-binding Ig-like lectin 8
Alternative protein LRFN1
cDNA FLJ56648
Talin-2
NES protein (Fragment)
cDNA, FLJ94377
Tensin-3 (Fragment)
Desmocollin 1, isoform CRA_b

Putative uncharacterized protein GAF1 (Fragment)
Rho GDP-dissociation inhibitor 1 (Fragment)
WD repeat and SOCS box-containing protein 1
Coiled-coil domain-containing protein 60
Dynein heavy chain 6, axonemal
PH-interacting protein
cDNA FLJ60422
cDNA, FLJ96589
Zinc finger protein 280D
Golgin subfamily B member 1
cDNA, FLJ93638
Rab-3A-interacting protein
Probable methyltransferase TARBP1
Contactin-2 (Fragment)
PX domain-containing protein kinase-like protein
Calmodulin-binding transcription activator 1
cDNA FLJ46506
Patched domain-containing protein 2
cDNA FLJ58505, highly similar to Cyclin-T2
cDNA FLJ44067 fis, clone TESTI4037066
Netrin receptor UNC5D
cDNA FLJ60276
cDNA FLJ53246
Transmembrane 9 superfamily member
Transketolase
Putative uncharacterized protein DKFZp686C06243 (Fragment)
Protein FAM186A
Phospholipid phosphatase 1
Bromodomain and WD repeat-containing protein 3
Slit homolog 3 protein
RanBP2-like and GRIP domain-containing protein 4
GRAM domain-containing protein 1A
Putative postmeiotic segregation increased 2-like protein 1
Lipopolysaccharide-responsive and beige-like anchor protein
Fatty acyl-CoA reductase (Fragment)
Exonuclease mut-7 homolog, isoform 5
Alternative protein ACTL7B
Thyroglobulin variant (Fragment)
Beta-galactosidase-1-like protein
Serine incorporator 4
cDNA FLJ44654
DNA polymerase zeta catalytic subunit
WAPAL protein
WD repeat-containing protein 87
Contactin-associated protein-like 4
Mitochondrial dynamics protein MID51
Heavy chain Fab (Fragment)
MICA protein (Fragment)
Retinoic acid-induced protein 1
LINE-1 type transposase domain-containing protein 1
TOG array regulator of axonemal microtubules protein 1
Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-dependent Rac exchanger 2 protein
cDNA, FLJ95432
cDNA FLJ10471
Cytochrome P450 4B1
Interleukin-31
Unconventional myosin-XVB
Chondroitin sulfate proteoglycan 4

Sushi, von Willebrand factor type A, EGF and pentraxin domain-containing protein 1
cDNA FLJ51102
WD repeat-containing protein 97
Neuropeptide S receptor
Uncharacterized gastric protein YC11P
cDNA FLJ46643
cDNA FLJ50019
Lysine-specific demethylase 8 (Fragment)
Protein cordon-bleu (Fragment)
Protein CDV3 homolog
DNA polymerase
cDNA FLJ76309
cDNA FLJ54526
B cell specific activator protein variant delta 6/7/8/9 (Fragment)
cDNA FLJ57821
DNA excision repair protein ERCC-6-like 2
Neurexin-3-beta
Papillary renal cell carcinoma isoform 2
WD repeat-containing protein 3 variant (Fragment)
Glypican 3
Transmembrane and immunoglobulin domain-containing protein 1
Acrosomal protein KIAA1210
Coiled-coil domain-containing protein 18
MICAL-like protein 1 (Fragment)
CDK5 regulatory subunit-associated protein 2
cDNA FLJ75605
cDNA FLJ90411
U7 snRNA-associated Sm-like protein LSm11
Coiled-coil domain-containing protein 66
cDNA FLJ54009
TFIIH basal transcription factor complex helicase XPD subunit
cDNA FLJ77769
Protocadherin beta 9 variant (Fragment)
DIS3-like exonuclease 2 (Fragment)
cDNA FLJ75649
Alternative protein ZNF132
DCTN1/ALK fusion protein (Fragment)
55 kDa erythrocyte membrane protein
Neuropilin and tolloid-like protein 1
Tensin-4
ERBB2IP protein
cDNA FLJ13927
PLEKHA5 protein
Protein furry homolog-like
cDNA FLJ52699
LOC554223 protein
Potassium voltage-gated channel subfamily F member 1
Calcium-responsive transcription factor
G-protein coupled receptor
HEAT repeat containing 1, isoform CRA_b
Sarcoma antigen 1
Protein inturnd
cDNA FLJ54377
ATXN2 protein (Fragment)
Protein THEMIS
SHUJUN-3
Ankyrin repeat and death domain-containing protein 1B
SEC14 domain and spectrin repeat-containing protein 1

ATPase Cu <sup>++</sup> transporting beta polypeptide variant (Fragment)
cDNA FLJ54093
Uncharacterized protein C17orf102
Mutant early onset breast cancer susceptibility protein 2 (Fragment)
Ral GTPase-activating protein subunit alpha-1
DNA mismatch repair protein Mlh3
Chromosome-associated kinesin KIF4A
Lysine-specific demethylase 5A
Integrin alpha-E
MICOS complex subunit MIC60 (Fragment)
Interferon regulatory factor 2 (Fragment)
Transcription factor SOX-6
Ral guanine nucleotide dissociation stimulator-like 3
La-related protein 4B
ST6 (Alpha-N-acetyl-neuraminy-2,3-beta-galactosyl-1, 3)-N-acetylgalactosaminide alpha-2,6-sialyltransferase 6, isoform CRA_d
Ecto-NOX disulfide-thiol exchanger 2
Succinate--CoA ligase [ADP-forming] subunit beta, mitochondrial
2-phosphoxylose phosphatase 1
Putative uncharacterized protein DKFZp686F2450 (Fragment)
E3 ubiquitin-protein ligase BRE1A
Ribonucleoside-diphosphate reductase
cDNA FLJ20131 fis, clone COL06357
TBC1 domain family member 8B
NLR family CARD domain-containing protein 4
Sperm associated antigen 9 variant 5
Protein Wnt
Connector enhancer of kinase suppressor of ras 3
Klotho
Phosphorylase b kinase regulatory subunit alpha, liver isoform
BPI fold-containing family B member 2
E3 ubiquitin-protein ligase RNF130
FLJ00058 protein (Fragment)
Tubulin polyglutamylase TTLL4
Laminin subunit alpha-3 (Fragment)
cDNA FLJ50413
Protein KRI1 homolog (Fragment)

**APÊNDICE E – Lista das proteínas exclusivas identificadas por espectrometria de massas na abordagem de digestão *in-solution* no grupo SDsDP**

<b>Nome da Proteína</b>
R33683_3 (Fragment)
Immunoglobulin kappa light chain
SNC66 protein
Zinc finger CCCH-type containing 7B, isoform CRA_b
Triple functional domain protein
Haptoglobin
Trinucleotide repeat-containing gene 6B protein
Putative uncharacterized protein DKFZp434I2435 (Fragment)
E3 ubiquitin-protein ligase TRIP12 (Fragment)
cDNA FLJ51596, highly similar to BRCA1-associated RING domain protein 1
Protein KIAA2022
Transcription factor SPT20 homolog (Fragment)
CLCNKB protein
cDNA FLJ16161
cDNA FLJ51645
E3 ubiquitin-protein ligase Itchy homolog
Ena/VASP-like protein (Fragment)
cDNA PSEC0075
Activating transcription factor 6 variant (Fragment)
Zinc finger CCCH domain-containing protein 4 (Fragment)
Putative segment polarity protein dishevelled homolog DVL1P1
Methylcytosine dioxygenase TET3
cDNA FLJ77598
Cytosolic Fe-S cluster assembly factor NARFL
Rabenosyn-5
Sodium channel protein type 3 subunit alpha
Interleukin 1 receptor antagonist, isoform CRA_a
14-3-3 protein zeta/delta
cDNA FLJ53691
cDNA FLJ54432, highly similar to Alpha-actinin-1
Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 1 (Fragment)
Pleckstrin homology domain-containing family A member 4
Pyruvate kinase
Integrin beta (Fragment)
Voltage-dependent L-type calcium channel subunit alpha
cDNA, FLJ79338
Mucin 20 cell surface-associated protein (Fragment)
OBSL1 protein
cDNA FLJ45404
cDNA FLJ75186
Nectin-3
Inactive rhomboid protein 1
Tau-tubulin kinase 2
Putative uncharacterized protein DKFZp686N02209
Fanconi anemia group B protein (Fragment)
Protein SCAF11
cDNA FLJ46841
Probable guanine nucleotide exchange factor MCF2L2 (Fragment)
Sorting nexin-33
Protein capicua homolog
cDNA FLJ57574
Utrophin
Microtubule-associated serine/threonine-protein kinase 1 (Fragment)

Paired mesoderm homeobox protein 2A
CUB and zona pellucida-like domain-containing protein 1
Zinc finger protein 558
Peroxisome biogenesis factor 1
cDNA FLJ54894
DFNB31 protein
BAH and coiled-coil domain-containing protein 1
cDNA FLJ53277
Poly [ADP-ribose] polymerase 14
cDNA FLJ60062
Zinc finger protein 154
Vacuolar protein sorting 13 homolog D ( <i>S. cerevisiae</i> ) (Fragment)
Piezo-type mechanosensitive ion channel component
Nuclear distribution protein nudE-like 1
Furry homolog ( <i>Drosophila</i> ), isoform CRA_c
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D-like
Transcription elongation factor A N-terminal and central domain-containing protein (Fragment)
Glutamate receptor ionotropic, kainate 2
Immunoglobulin superfamily member 2
HSH2D protein (Fragment)
cDNA FLJ61714
STK24 protein (Fragment)
cDNA FLJ76659
AF4/FMR2 family member 4
cDNA FLJ16524
CAP-Gly domain-containing linker protein 1
Interferon regulatory factor 3c
cDNA FLJ35478
von Willebrand factor C and EGF domain-containing protein
RANBP2-like and GRIP domain-containing protein 1
KIF18B protein (Fragment)
DNA topoisomerase
HCG21296, isoform CRA_a
cDNA FLJ46612
Fatty acid-binding protein 12
Phospholipase A2
MHC class II antigen (Fragment)
Ankyrin repeat domain-containing protein 49 (Fragment)
CD44 antigen
Cystatin-A
Parkin isoform
Putative uncharacterized protein DKFZp686F19123 (Fragment)
Protein APCDD1 (Fragment)
cDNA FLJ58806
Tubulin alpha chain
Potassium voltage-gated channel subfamily KQT member 5

**APÊNDICE F – Lista das proteínas exclusivas identificadas por espectrometria de massas na abordagem de digestão *in-solution* no grupo SDcDP**

<b>Nome da Proteína</b>
Serum albumin
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (Fragment)
Serine-rich coiled-coil domain-containing protein 1
Pre-mRNA-processing factor 6
JMJD1B protein (Fragment)
Ephrin type-B receptor 6
cDNA FLJ53860
Haptoglobin (Fragment)
Amyloid beta (A4) protein-binding, family A, member 3 variant (Fragment)
Protein tyrosine phosphatase receptor type C (Fragment)
Putative uncharacterized protein GSN-AS1
cDNA FLJ56800
Fibronectin
cDNA, FLJ95509
Arf-GAP with GTPase, ANK repeat and PH domain-containing protein 1
Zinc finger protein 64 homolog, isoforms 3 and 4
Roundabout homolog 2
Adenosylhomocysteinase
E3 ubiquitin-protein ligase RNF19A
IgG L chain
Ankyrin repeat and KH domain-containing protein 1
Zinc finger protein 395
IBTK protein
Protein sprouty homolog 1 (Fragment)
Nesprin-1
Rho GTPase activating protein 6 isoform 1 variant (Fragment)
KIAA0638 splice variant 2 (Fragment)
Synphilin-1 (Fragment)
Zinc finger CCCH-type antiviral protein 1 (Fragment)
cDNA FLJ54656
Tensin like C1 domain containing phosphatase (Tensin 2)
Proline and serine-rich protein 3
Espin (Fragment)
cDNA FLJ56608
Lysine-specific demethylase 6B (Fragment)
Interleukin-12 receptor subunit beta-2
Armadillo repeat-containing protein 3
Supervillin
G-protein coupled receptor 98
cDNA FLJ43914
Fatty acid 2-hydroxylase
Teneurin-1
Protein FAM110A (Fragment)
TRIO and F-actin-binding protein
cDNA FLJ43009
Arf-GAP with SH3 domain, ANK repeat and PH domain-containing protein 1
Immunoglobulin heavy constant alpha 2 (Fragment)
Transcription factor SPT20 homolog
Oxysterols receptor LXR-beta (Fragment)
cDNA FLJ57254, highly similar to Protein deltex-2
Leucine-rich repeat transmembrane protein FLRT1
KRTAP10-6 protein
Cytosolic phospholipase A2 beta

cDNA FLJ51596
Transducin-like enhancer protein 3
Adenomatous polyposis coli protein 2
Tigger transposable element-derived protein 1
cDNA FLJ57190
BTB/POZ domain-containing protein KCTD3
Aconitate hydratase, mitochondrial
cDNA FLJ76439
cDNA, FLJ96628
Uncharacterized protein C12orf43 (Fragment)
HSPC271 (Fragment)
Janus kinase and microtubule-interacting protein 1
Polyhomeotic-like protein 1
Dedicator of cytokinesis 5, isoform CRA_a
FERM domain-containing protein 4B
Pleckstrin homology domain-containing family H member 1
Protein WWC2
MST148 protein
Furin (Fragment)
Oxygen-regulated protein 1
mRNA decay activator protein ZFP36L2
Transcription factor E3
Ras-specific guanine nucleotide-releasing factor RalGPS1
Neuronal tyrosine-phosphorylated phosphoinositide-3-kinase adapter 2
Protein FAM193B (Fragment)
cDNA FLJ56510
Serine/threonine-protein kinase MRCK alpha
KIAA0324 (Fragment)
Voltage-dependent T-type calcium channel subunit alpha-1H (Fragment)
Palmitoyltransferase ZDHHC5
Spermatogenesis-associated protein 31D1
PHD finger protein 3
Retinitis pigmentosa 1-like 1 protein
EXOC7 protein
Inactive rhomboid protein
Nuclear receptor coactivator 7, isoform CRA_c
Phosphodiesterase (Fragment)
Pleckstrin homology-like domain family B member 2
Cyclin D3, isoform CRA_a
MHC Class I Antigen
Centrosomal protein of 164 kDa
Ankyrin-2
Selectin-like protein
BTB/POZ domain-containing protein 8
BDP1 protein (Fragment)
Disks large-associated protein 2
Dyslexia-associated protein KIAA0319-like protein (Fragment)
Pecanex-like protein 3
SLIT and NTRK-like protein 2
Kinesin-like protein KIF26B
Keratin, type II cuticular Hb4
DNA-binding protein Ikaros
Alpha-internexin
Dedicator of cytokinesis protein 7
Bile salt export pump (Fragment)
Tubulin-specific chaperone E
Neuronal acetylcholine receptor subunit alpha-10
Disrupted in schizophrenia 1 isoform 40

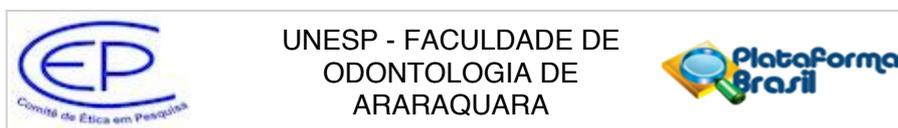
ATP synthase mitochondrial F1 complex assembly factor 2 (Fragment)
Voltage-dependent P/Q-type calcium channel subunit alpha-1A (Fragment)
Hemoglobin alpha-1 globin chain (Fragment)
cDNA FLJ55803
Homeobox protein Hox-B1
GCT-A3 light chain variable region (Fragment)
ABI gene family, member 3 (NESH) binding protein, isoform CRA_d
E3 SUMO-protein ligase RanBP2
Solute carrier organic anion transporter family member 1C1
UDP-GlcNAc:betaGal beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 8
Dynein heavy chain 10, axonemal (Fragment)
Telomerase protein component 1 variant (Fragment)
Interleukin-2 receptor (Fragment)
Uncharacterized protein C16orf59 (Fragment)
MGA protein
Microtubule-associated tumor suppressor 1
Zinc finger MYM-type protein 1 (Fragment)
cDNA FLJ42271 fis, clone TKIDN2015788
CPXM2 protein
cDNA FLJ25862
V2-7 protein (Fragment)
Isthmin-2 (Fragment)
Protein SOGA3
cDNA FLJ54303
Alpha-1-antitrypsin
Triosephosphate isomerase (Fragment)
Keratin, type II cytoskeletal 73
Keratin, type II cytoskeletal 78
cDNA, FLJ95131
Chromodomain Y-like protein (Fragment)
HCG2019817, isoform CRA_b
DNA excision repair protein ERCC-6-like
Melanoma inhibitory activity protein 3 (Fragment)
cDNA FLJ43127
Chromosome 1 open reading frame 51
Protein FAM126B
Filamin A-interacting protein 1-like
Coxsackievirus and adenovirus receptor
cDNA FLJ45802
TIA1 cytotoxic granule-associated RNA-binding protein-like 1 isoform 2 variant (Fragment)
1-phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate phosphodiesterase epsilon-1
Cytochrome P450
Filamin A interacting protein 1, isoform CRA_c
Protein FAM124A
Glutathione S-transferase P (Fragment)
Lysozyme C
Dynamamin-binding protein
Serine/threonine-protein kinase PAK 6
Kell blood group antigen Cellano
cDNA, FLJ93988
Protein HIRA
Zinc finger CCHC domain-containing protein 2 (Fragment)
Treacle protein (Fragment)
Coiled-coil domain-containing protein 71
NADH dehydrogenase (Ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 10, 42kDa, isoform CRA_c
Protein Daple
KCNB1 protein (Fragment)
High glucose-regulated protein 8

Protein FAM71C
VWFA and cache domain-containing protein 1
Major vault protein isoform E
FERM and PDZ domain-containing protein 2
cDNA FLJ53463
cDNA FLJ50627
cDNA FLJ54555
TMPRSS13 protein
Usher syndrome 2A
Myelin regulatory factor
Testis development protein NYD-SP26, isoform CRA_a
Protein phosphatase 1, regulatory (Inhibitor) subunit 12B, isoform CRA_b
U3 small nucleolar RNA-associated protein 4 homolog (Fragment)
Dedicator of cytokinesis protein 4 (Fragment)
cDNA FLJ60847
Glucose-6-phosphate isomerase (Fragment)
Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein zeta (Fragment)
PCM1 protein
Netrin-5
Fanconi anemia group D2 protein
Protein PRRC2C (Fragment)
GCN1 general control of amino-acid synthesis 1-like 1 (Yeast), isoform CRA_b
Contactin-1
Putative Polycomb group protein ASXL2
Zinc finger protein 507
Bromodomain adjacent to zinc finger domain, 1A, isoform CRA_c
Zonadhesin
Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1
cDNA FLJ76841
Unconventional myosin-Ixa
BCL6 corepressor/retinoic acid receptor alpha fusion protein
FAM178A protein (Fragment)
TCF7L2 isoform pFC8A_TCF7L2_ex1-11-13-14
cDNA FLJ75310
Probable ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase FAF-Y
Carbohydrate sulfotransferase 1
Leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains protein 3
Adenylyl cyclase-associated protein 1 (Fragment)
Septin-14
Ubiquitin specific peptidase 19, isoform CRA_a
cDNA FLJ58176
Sodium channel protein
eIF-2-alpha kinase GCN2 (Fragment)
Coiled-coil domain-containing protein 88B
Cadherin EGF LAG seven-pass G-type receptor 3
Protein flightless-1 homolog
Voltage-dependent L-type calcium channel subunit beta-1
Transcription factor Maf
Androglobin
HCG2039182, isoform CRA_b
Putative uncharacterized protein FLJ38379
cDNA FLJ75992
cDNA FLJ34130
Spinster, isoform CRA_f
cDNA FLJ54921
TSHZ1 protein (Fragment)
ATRX protein
Rho guanine nucleotide exchange factor 11

Cytoskeleton-associated protein 4
Myelin transcription factor 1-like protein (Fragment)
Disks large homolog 5
Ras and Rab interactor 2
Kidney ankyrin repeat-containing protein 3
Proprotein convertase subtilisin/kexin type 5
Rho GDP-dissociation inhibitor 2 (Fragment)
Complement factor B (Fragment)
Putative ankyrin repeat domain-containing protein 31
Pyruvate kinase (Fragment)
Mis18-binding protein 1
Soluble scavenger receptor cysteine-rich domain-containing protein SSC5D
Ectopic P granules protein 5 homolog (Fragment)
YY1AP-related protein1
cDNA FLJ75516
Transcription factor SOX-10
cDNA FLJ53535
Cell surface glycoprotein CD200 receptor 1
Dematin
Transcription factor 4 (Fragment)
Putative uncharacterized protein pp11741
Protein kinase N2, isoform CRA_b
Tyrosine-protein kinase receptor UFO
Zinc finger transcription factor Trps1
Nuclear receptor subfamily 5 group A member 2 (Fragment)
Small nuclear ribonucleoprotein F
HCG42028, isoform CRA_a
Alpha-adducin (Fragment)
Semaphorin-4F
Multidrug resistance-associated protein 9
H_YH98E06.1 protein (Fragment)
cDNA FLJ77399
GTF2H2C protein
Spermatogenesis-associated protein 6
ELK4, ETS-domain protein (SRF accessory protein 1), isoform CRA_a
Phosphofructokinase muscle isoform 3 (Fragment)
RE1-silencing transcription factor
Phospholipase B1
Alternative protein CBLL1
Lymphoid-restricted membrane protein
Coiled-coil domain-containing protein 187
Thymic stromal cotransporter homolog
Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 4 (Fragment)
Nebulin (Fragment)
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase
RAS guanyl-releasing protein 1
Low density lipoprotein receptor-related protein 4, isoform CRA_a
Testicular haploid-expressed gene protein
TLL5 protein (Fragment)
Dapper homolog 3
PAK2
Voltage-dependent anion-selective channel protein 2 (Fragment)
Protein FAM102A
PWWP domain-containing protein MUM1
ZFP2 protein
Myeloid cell surface antigen CD33
Huntingtin
Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 3 (Fragment)

Zinc finger and BTB domain-containing protein 40
Huntingtin-interacting protein 1
cDNA FLJ59828,
Coiled-coil domain-containing protein 14
Dystrophin (Fragment)
Threonine synthase-like 1
Condensin-2 complex subunit D3
cDNA FLJ51444
FLJ00397 protein (Fragment)
Nucleolar protein 4, isoform CRA_c
Hydrocephalus-inducing protein homolog
PHD finger protein 12 (Fragment)
Dynein heavy chain 3, axonemal
RIMS-binding protein 3C
cDNA FLJ16598
THAP domain-containing protein 4
Protein FAM102B
Similar to FLJ40113 protein
Dystrophin related protein 2 variant (Fragment)
FRAS1-related extracellular matrix protein 3
Nuclear protein, ataxia-telangiectasia locus
T-box transcription factor TBX22
Phosphoglycerate kinase
Thymidine phosphorylase
cDNA FLJ35733
Proline-rich protein 19 (Fragment)
Adenylyl cyclase-associated protein
OXCT2 protein
cDNA FLJ34045
Testicular tissue protein Li 70
Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1
Catalase
SET binding factor 1, isoform CRA_a
Protein moonraker
cDNA FLJ34113
C-Jun-amino-terminal kinase-interacting protein 4
HCG1985469, isoform CRA_b
cDNA FLJ54422
SPANX-C
Glutamate-rich protein 3
mRNA-decapping enzyme 1B
Centromere protein C (Fragment)
Suprabasin
cDNA FLJ58887
Transcription factor GATA-5

## ANEXO A – Parecer consubstanciado do CEP



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Degradação de histatinas salivares em indivíduos com síndrome de Down e influência antibacteriana sobre periodontopatógenos

**Pesquisador:** Elisa Maria Aparecida Giro

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 56686416.0.0000.5416

**Instituição Proponente:** Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 1.603.989

#### Apresentação do Projeto:

O projeto "Degradação de histatinas salivares em indivíduos com síndrome de Down e influência antibacteriana sobre periodontopatógenos" foi devidamente apresentado.

#### Objetivo da Pesquisa:

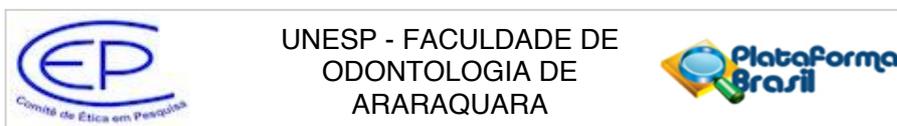
Os objetivos estão descritos de forma clara. O estudo visa comparar a degradação proteica da histatina 1 e da histatina 5 na saliva total estimulada de indivíduos com SD e não síndrômicos na presença e na ausência da DP. Além disso, também será avaliado se produtos da degradação destas proteínas mantêm algum nível de atividade antimicrobiana sobre periodontopatógenos.

#### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

**Benefícios:** Além da contribuição científica para o melhor entendimento da progressão da DP em pacientes com SD e no desenvolvimento de novas terapias que beneficiem essa parcela da população, o pesquisador relata que caso durante o exame clínico seja observada necessidade de tratamento odontológico, o voluntário será encaminhado para receber os cuidados necessários. Será oferecida também orientação sobre adequada higienização oral, enfatizando sua importância para a manutenção da saúde oral.

**Riscos:** O pesquisador relata que existe um risco mínimo aos participantes, pois, a coleta da saliva é uma técnica não invasiva, indolor e rápida, além disso serão utilizados materiais estéreis e

**Endereço:** HUMAITA 1680  
**Bairro:** CENTRO **CEP:** 14.801-903  
**UF:** SP **Município:** ARARAQUARA  
**Telefone:** (16)3301-6459 **E-mail:** cep@foar.unesp.br



Continuação do Parecer: 1.603.989

descartáveis. Caso algum participante venha a sentir qualquer mal-estar ou desconforto decorrente do exame clínico ou durante a coleta de saliva, ele será totalmente assistido pelo pesquisador responsável e demais pesquisadores. Os pesquisadores também se comprometem a manter a identidade de todos os participantes em sigilo, evitando assim qualquer eventual constrangimento. Os pesquisadores farão uso de EPIs.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

O projeto trará contribuição para a área ao qual se aplica.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Todos os termos foram apresentados. Além dos TCLE foi apresentado um termo de assentimento para os pacientes com síndrome de Down.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

O projeto está adequado.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Protocolo APROVADO em reunião de 23 de junho de 2016.

O pesquisador deverá encaminhar relatórios parciais a cada 01 (um) ano até o prazo final da pesquisa, quando deverá encaminhar o relatório final.

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_646248.pdf	01/06/2016 15:41:44		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termo_de_Assentimento.pdf	01/06/2016 15:39:25	Natália Bertolo Domingues	Aceito
Outros	Autorizacao_Clinica_Periodontia.pdf	01/06/2016 15:38:24	Natália Bertolo Domingues	Aceito
Outros	Autorizacao_Clinica_Infantil.pdf	01/06/2016 15:37:59	Natália Bertolo Domingues	Aceito
Outros	Autorizacao_APAAE.pdf	01/06/2016 15:37:33	Natália Bertolo Domingues	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_de_Pesquisa.pdf	01/06/2016 15:36:38	Natália Bertolo Domingues	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_Rosto.pdf	01/06/2016 15:35:59	Natália Bertolo Domingues	Aceito

Endereço: HUMAITA 1680

Bairro: CENTRO

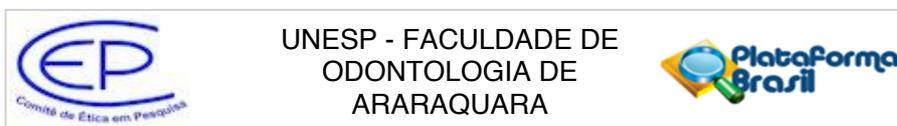
UF: SP

Telefone: (16)3301-6459

Município: ARARAQUARA

CEP: 14.801-903

E-mail: cep@foar.unesp.br



Continuação do Parecer: 1.603.989

TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_SD.pdf	31/05/2016 11:39:01	Natália Bertolo Domingues	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_NS.pdf	31/05/2016 11:38:49	Natália Bertolo Domingues	Aceito
Outros	Declaracao_de_Cumprimento_das_Normas.pdf	31/05/2016 11:38:33	Natália Bertolo Domingues	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

ARARAQUARA, 24 de Junho de 2016

---

**Assinado por:**  
**Lígia Antunes Pereira Pinelli**  
**(Coordenador)**

**Endereço:** HUMAITA 1680  
**Bairro:** CENTRO **CEP:** 14.801-903  
**UF:** SP **Município:** ARARAQUARA  
**Telefone:** (16)3301-6459 **E-mail:** cep@foar.unesp.br

## ANEXO B - Ficha para exame clínico periodontal

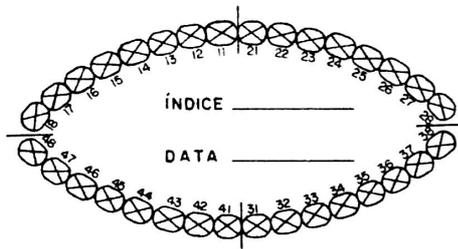
**EXAME INTRA BUCAL:**

Aspecto da mucosa oral: \_\_\_\_\_

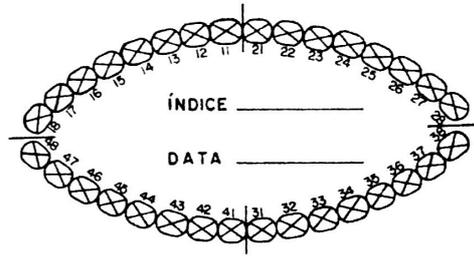
Outros: \_\_\_\_\_

Estado atual da Higiene Bucal:  Muito Boa (< 10%)       Boa (11-25%)       Regular (26-35%)       Péssima (> 35%)

Placa Visível:



Sangramento Marginal:



Dente	18	17	16	15	14	13	12	11	21	22	23	24	25	26	27	28
Furca																
Mob.																
Sítio	D	V	M	D	V	M	D	V	M	D	V	M	D	V	M	D
Sangr.																
N.G.																
P.S.																
N.I.																

Sítio	D	L	M	D	L	M	D	L	M	D	L	M	D	L	M	D
Sangr.																
N.G.																
P.S.																
N.I.																

Dente	48	47	46	45	44	43	42	41	31	32	33	34	35	36	37	38
Furca																
Mob.																
Sítio	D	V	M	D	V	M	D	V	M	D	V	M	D	V	M	D
Sangr.																
N.G.																
P.S.																
N.I.																

Sítio	D	L	M	D	L	M	D	L	M	D	L	M	D	L	M	D
Sangr.																
N.G.																
P.S.																
N.I.																

EXAME INICIAL    Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_    Assinatura Paciente: \_\_\_\_\_    Pront.: \_\_\_\_\_

## ANEXO C - Índices de cárie dentária (CPO e ceo)

### Índice de cárie dentária (decíduos entre parênteses) – (OMS, 1997)

Códigos	Critérios para avaliação
<b>0(A) - Coroa hígida</b>	<p>Não há evidência de cárie. Estágios iniciais da doença não são levados em consideração. Os seguintes sinais devem ser codificados como hígidos:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• manchas esbranquiçadas ou porosas;</li> <li>• descolorações ou manchas rugosas que não sejam amolecidas ao toque de uma sonda IPC metálica;</li> <li>• áreas escuras, brilhantes, duras e fissuradas do esmalte de um dente com fluorose moderada ou severa;</li> <li>• sulcos e fissuras pigmentadas no esmalte, mas que não apresentam sinais visuais de base amolecida, esmalte socavado ou amolecimento das paredes, detectáveis com a sonda IPC;</li> <li>• lesões que, com base na sua distribuição ou história, ou exame tátil/visual, parecem ser devidas à abrasão.</li> </ul>
<b>1(B) - Coroa cariada</b>	<p>A cárie é considerada presente quando uma lesão em uma fóssula ou fissura, ou em uma superfície lisa, tem uma cavidade inconfundível, esmalte socavado, assoalho ou parede detectavelmente amolecidos. Um dente com restauração provisória, ou que está selado [código 6 (F)], mas também cariado, também deve ser incluído nesta categoria. No caso em que a coroa tenha sido destruída por cárie e somente a raiz tenha restado, a cárie é considerada como tendo originado-se na coroa, e portanto somente classifica-se como cárie coronária. A sonda IPC deve ser utilizada para confirmar evidências visuais de cárie na oclusal, vestibular e lingual. Na dúvida, considerar o dente hígido.</p>

**2(C) - Coroa restaurada, porém cariada.** Há uma ou mais restaurações e ao mesmo tempo, uma ou mais áreas estão cariadas. Não há distinção entre cáries primárias e secundárias, ou seja, se as lesões estão ou não em associação física com a(s) restauração(ões).

**3(D) - Coroa restaurada e sem cárie.** Há uma ou mais restaurações definitivas e inexistente cárie em algum ponto da coroa. Um dente com coroa colocada devido à cárie inclui-se nesta categoria. Se a coroa resulta de outras causas, como suporte de prótese, é codificada como 7 (G).

*Nota:* Com relação aos códigos 2(C) e 3(D), apesar de ainda não ser uma prática consensual, a presença de ionômero de vidro em qualquer elemento dentário será considerada, neste estudo, como condição para elemento restaurado.

**4(E) - Dente ausente como resultado de cárie** Dente permanente ou decíduo extraído por causa de cárie e não por outras razões. Essa condição é registrada na casela correspondente à coroa. Dentes decíduos: aplicar apenas quando o indivíduo está numa faixa etária na qual a exfoliação normal não constitui justificativa suficiente para a ausência dentária.

*Nota:* Em algumas idades pode ser difícil distinguir entre dente não irrompido (código 8) e dente perdido (códigos 4 ou 5). Fazer relações (cronologia da irrupção, experiência de cárie etc.) pode ajudar na tomada de decisão.

**5(F) - Dente perdido por outra razão** Ausência se deve à razões ortodônticas, periodontais, traumáticas ou congênitas.

*Nota:* O código para decíduos (F) nestes casos deverá ser mais utilizado na faixa etária de 18 a 36 meses, uma vez que, a partir dos 5 anos, geralmente o espaço vazio se deve à exfoliação

natural e deverá ser codificado como coroa não erupcionada (código 8).

**6(G) - Selante** Há um selante de fissura ou a fissura oclusal foi alargada para receber um compósito. Se o dente possui selante e está cariado, prevalece o código 1 ou B(cárie).

**7(H) - Apoio de ponte ou coroa** Indica um dente que é parte de uma prótese fixa. Este código é também utilizado para coroas instaladas por outras razões que não a cárie ou para dentes com facetasestéticas. Dentes extraídos e substituídos por um elemento de ponte fixa são codificados, na casela da condição da coroa, como 4 ou 5.

**8(K) - Coroa não irrompida** Dente permanente ou decíduo ainda não está irrompido, atendendo à cronologia da irrupção. Não inclui dentes perdidos por problemas congênitos, trauma etc. Os dentes classificados como não irrompidos são excluídos de todos os cálculos relativos à cárie dentária.

**T(T) - Trauma (Fratura)** Parte da superfície coronária foi perdida em consequência de trauma e não há evidência de cárie.

**9(L) - Dente excluído** Aplicado a qualquer dente permanente que não possa ser examinado (bandas ortodônticas, hipoplasias severas etc.).

---

**Não autorizo a publicação deste trabalho até 14/02/2021**

**(Direitos de publicação reservado ao autor)**

**Araraquara, 14 de fevereiro de 2019.**

**Natália Bertolo Domingues**