

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 14/02/2021.



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^a. Dr^a. 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^a. Dr^a. Elisa Maria Aparecida Giro

2º Examinador: Prof^a. Dr^a. Ana Luísa Botta Martins de Oliveira

3º Examinador: Prof^a. Dr^a. Debora Heller

4º Examinador: Prof^a. Dr^a. Raquel Mantuanelli Scarel-Caminaga

5º Examinador: Prof^a. Dr^a. 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^ª. Dr^ª 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^a. Dr^a. Elaine Maria Sgaviolli Massucato e pelo vice-diretor Prof. Dr. Edson Alves de Campos.

Aos professores da banca examinadora, Prof^a. Dr^a. Elisa Maria Aparecida Giro, Prof^a. Dr^a. Ana Luísa Botta Martins de Oliveira, Prof^a. Dr^a. Debora Heller, Prof^a. Dr^a. Raquel M. Scarel Caminaga e Prof^a. Dr^a. 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^a. Dr^a. 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^a. Dr^a. 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^a. Dr^a. 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^a. Dr^a. 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^a. Dr^a. 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), aliquotada 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) histatin1 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

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

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

1 INTRODUÇÃO

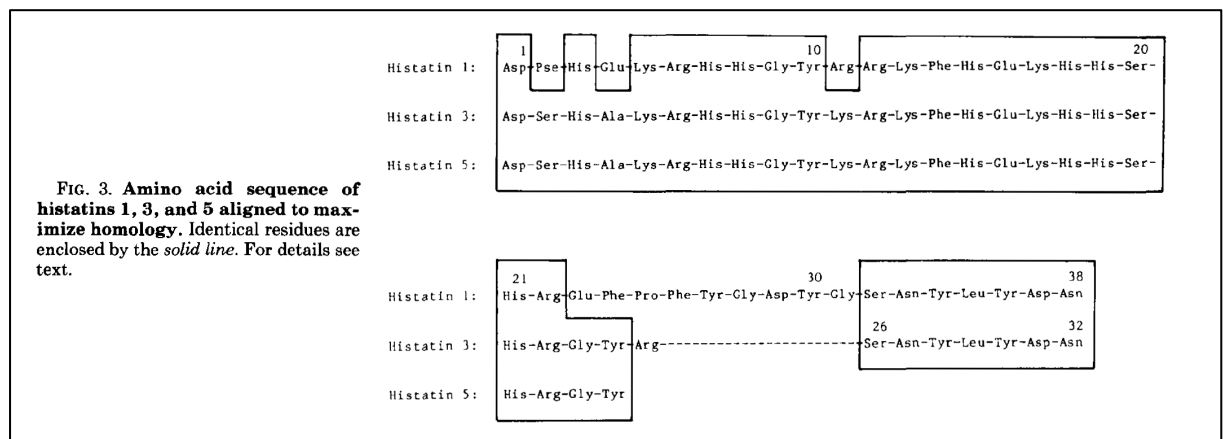
A síndrome de Down (SD), conhecida também como trissomia do cromossomo 21, pode implicar em algumas manifestações bucais como atresia maxilar, palato ogival, pseudomacroglossia, língua fissurada e anomalias dentárias^{1,2}. Também está bem estabelecido que indivíduos com SD, quando comparados aos cromossomicamente normais, apresentam fluxo salivar reduzido³⁻⁵. 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 precoce⁶⁻⁹. A alta prevalência da DP em indivíduos com SD pode ser explicada devido a fatores de risco sistêmicos como, deficiências imunológicas^{10,11} e alterações no sistema de defesa antioxidante^{5,12}, associadas a fatores de risco locais como, colonização precoce¹³⁻¹⁵ e quantidade aumentada de micro-organismos periodontopatogênicos na cavidade bucal^{16,17}, alterações anatômicas dentárias, características salivares e higiene bucal insatisfatória¹⁸.

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 bucal¹⁹. Este fluido é também um dos mais complexos do corpo humano, contendo moléculas sintetizadas tanto localmente quanto sistemicamente^{20,21}. A composição salivar inclui substâncias derivadas do fluido crevicular, soro e células sanguíneas, células descamadas do epitélio intrabucal e subprodutos bacterianos²¹⁻²³. 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 paciente²⁴.

Em termos estruturais, na porção orgânica salivar é possível identificar 2290 proteínas^{19,25}, entre as quais, se destacam as proteínas ricas em prolina, as amilases, as mucinas, as cistatinas, as estaterinas e as histatinas¹⁹. O particular interesse no estudo das histatinas se deve ao fato de que estas proteínas possuem propriedades biológicas bem definidas²⁶⁻²⁸ e contribuem para a homeostase da cavidade bucal^{26,29-32}. Entre as histatinas secretadas, as principais formas encontradas (80%) são as histatinas 1, 3 e 5^{29,33}, as quais contêm 38, 32 e 24 resíduos de aminoácidos, respectivamente^{29,34} (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^{31,32}, do processo de tamponamento e desempenham ação antifúngica e antibacteriana^{26,30,31,35}. A histatina 1 é a única fosforilada³¹ e possui a capacidade de inibir o crescimento de cristais de sais de fosfato de cálcio²⁹. A histatina 5, possui forte ação antifúngica, já comprovada por ser a mais eficaz entre as histatinas contra fungos patogênicos como a *Candida albicans*^{26,29,35,36}. Além da ação antifúngica, outros estudos in vitro demonstraram efeitos antimicrobianos das histatinas sobre *Streptococcus mutans*³⁷⁻³⁹, e inibição de proteases produzidas por *Porphyromonas gingivalis*⁴⁰⁻⁴³ e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*⁴⁴, 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. ²⁹, 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 gengivite⁴⁵⁻⁴⁷. 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^{28,34,48}. 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^{26,49,50}. Desta maneira, o foco principal dos trabalhos está voltado para a degradação proteica das histatinas^{26,27,31,32,51,52}, uma vez que a proteólise pode ser considerada a maior responsável pelos baixos níveis de algumas proteínas salivares em sua forma intacta⁵².

A etapa da degradação proteolítica que ocorre na cavidade bucal é desencadeada principalmente por enzimas derivadas de bactérias ou células epiteliais do hospedeiro^{51,53,54}. Entretanto, também contribuem para esse processo a formação de complexos proteicos⁵⁵, a interação com células microbianas^{56,57} e a ligação das histatinas a tecidos duros e moles⁵⁸. Essa somatória de eventos torna a proteólise extremamente rápida^{26,38,51,59} e impossibilita o estudo das várias etapas da degradação proteolítica intraoral^{26,52}. Uma alternativa é a utilização do sobrenadante da saliva total (SST) onde a proteólise ocorre cerca de 7,5 vezes mais lentamente⁶⁰, 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^{51,53,54}, 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 mesma²⁰, 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^{20-23,61-63}, 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.

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, Zigmond 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, Morisakib 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 E2, leukotriene B4, 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, Zítnanová 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 α -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 α -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 activates 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://bioinfo.gp.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. α -Amylase is a potential growth inhibitor of *Porphyromonas gingivalis*, a periodontal pathogenic bacterium. *J Periodontal Res.* 2014; 49(1): 62-8.
172. Lindahl P, Alriksson 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.