

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

JULIANA XIMENES DAMASCENO

**NÍVEIS DE IMUNOGLOBULINAS NA SALIVA DE CRIANÇAS E ADOLESCENTES
PORTADORES DE HEPATITE AUTOIMUNE.**

FORTALEZA

2012

JULIANA XIMENES DAMASCENO

NÍVEIS DE IMUNOGLOBULINAS
NA SALIVA DE CRIANÇAS E ADOLESCENTES PORTADORES DE HEPATITE
AUTOIMUNE.

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Odontologia.

Área da concentração: Clínica Odontológica.

Orientadora: Profa. Dra. Cristiane Sá Roriz Fonteles.

Coorientadora: Profa. Dra. Christiane Araujo Chaves Leite.

FORTALEZA

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências da Saúde

D162n Damasceno, Juliana Ximenes
Níveis de imunoglobulinas na saliva de crianças e adolescentes portadores de hepatite autoimune/ Juliana Ximenes Damasceno. – 2012.
108 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Fortaleza, 2012.
Orientação: Profª. Dra. Cristiane Sá Roriz Fonteles.
Coorientação: Profª. Dra. Christiane Araujo Chaves Leite.

1. Hepatite Auto-Imune 2. Saliva 3. Imunoglobulinas 4. Proteínas e Peptídeos Salivares I.
Título.

CDD 616.3623

JULIANA XIMENES DAMASCENO

NÍVEIS DE IMUNOGLOBULINAS NA SALIVA DE CRIANÇAS E ADOLESCENTES
PORTADORES DE HEPATITE AUTOIMUNE.

Dissertação apresentada à Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da
Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em
Odontologia.

Aprovada em: ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Profª. Dra. Cristiane Sá Roriz Fonteles (Orientadora)

Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes Filho

Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof. Dra. Maria Izabel Florindo Guedes

Universidade Estadual do Ceará - UECE

Dedico este trabalho em primeiro lugar a
Deus, à minha mãe Saskia, e ao meu pai, Jeovani.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a Deus, por se fazer presente em todos os momentos da minha vida, sempre me abençoando, me protegendo de todo mal e me proporcionando o necessário para a vida, por meio de muita saúde, paz, força e fé.

À minha mãe, Saskia, que durante toda a minha vida se mostrou um exemplo de mulher forte, corajosa e batalhadora, o meu exemplo do que é ser um vencedor!

Ao meu pai, Jeovani, que sempre se mostrou um ser humano sensível, sempre pronto para ofertar muito amor, carinho, cuidado e muita diversão.

A toda a minha família (irmãs, primos, tios e avós) por todo apoio prestado em algum momento da minha vida, que certamente representou bastante nessa caminhada.

À minha orientadora, professora Dra. Cristiane Sá Roriz Fonteles, pela oportunidade concedida de receber seus ensinamentos não apenas no âmbito da graduação e pós-graduação, mas também aqueles de cunho profissional e pessoal que certamente me levaram, a partir dos erros cometidos por mim e apontados de forma extremamente clara, a modificar minha postura para o caminho correto, me proporcionando engrandecimento em todos os aspectos da minha vida.

À professora Dra. Christiane Araujo Chaves Leite, minha coorientadora, pela ajuda, apoio, orientação e facilidade de acesso ao ambulatório de Hepatologia Pediátrica do Hospital Universitário Walter Cantídio.

À professora Dra. Maria Izabel Florindo Guedes, por permitir a realização deste trabalho no laboratório de Bioquímica Humana, sob sua coordenação na Universidade Estadual do Ceará, por ter me recebido como uma verdadeira mãe, pela importante contribuição e orientação durante toda análise, por todo incentivo, pelo exemplo de dedicação com à pesquisa e, também, por aceitar o convite para fazer parte da banca avaliadora da presente dissertação.

Ao professor Dr. Sérgio, pela atenção, paciência, conhecimentos compartilhados e pelo exemplo de pesquisador.

À professora Dra. Lidiany Karla Azevedo Rodrigues, coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UFC, pela competência, pelo apoio e atenção sempre prestada.

Ao professor Dr. André Jalles, pela concretização da análise estatística deste estudo.

Ao professor Dr. Manoel Odorico Moraes Filho, por ter aceito o convite para compor a banca examinadora do presente trabalho e certamente contribuir com os seus conhecimentos.

A todos os professores do Programa de Pós - Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Ceará que, em algum momento, contribuíram com a construção dos ensinamentos que eu levo comigo.

Aos funcionários Ilka, do ambulatório de Hepatologia Pediátrica do Hospital Universitário Walter Cantídio; Silvia, do laboratório de Farmacologia Metabólica e Fisiologia Celular da UFC e Emanuelle, do laboratório de Bioquímica Humana da UECE, pelo agradável convívio e o importante auxílio prestado em diferentes momentos deste estudo.

Aos funcionários do Programa de Pós - Graduação em Odontologia, Lúcia e Janaíne, pela paciência, ajuda e atenção.

A todos os colegas de mestrado, dos mais próximos aos mais distantes, pela amizade, convivência e momentos compartilhados nessa caminhada. Com certeza, cada um de vocês, ao seu modo, acrescentou algo na minha história e fez com que essa página da minha vida fosse escrita de uma maneira muito especial.

À Dra. Adriana, Beatriz, Érico, Jorgeana, Karla, ao Luciano, a Rebeca, a Thyciana e aos integrantes do projeto SEMENTE, pelo companheirismo do nosso grupo de extensão pesquisa.

Aos amigos do laboratório de Bioquímica Humana, Fábio, Irmã Aila, Isaac, Júnior, Malu, Márcia, Professora Lia, Silmária e a todos os bolsistas de graduação, integrantes do

laboratório, pela amizade construída, acolhimento, companheirismo, esforço, dedicação, preocupação, aprendizado, ajuda, apoio, torcida, pelos momentos de descontração e risadas durante todo o período que eu estive realizando esta pesquisa. Sou muito grata pela oportunidade que a vida me proporcionou de ter me aproximado de seres humanos tão exemplares e caridosos como vocês.

Ao meu amigo Eymard, pela atenção, paciência e auxílio essenciais para escrita e apresentação deste trabalho.

Ao Paulo Felipe, por sua ajuda e orientação nas análises estatísticas.

A todos os meus amigos, construídos ao longo da minha vida, por serem peças fundamentais da minha existência e por seus pensamentos positivos, apoio e torcida depositados para todos os projetos da minha vida.

À professora Ana, pela realização da revisão gramatical.

À CAPES, pelo apoio financeiro.

Enfim, a todos que direta ou indiretamente contribuíram muito para realização deste trabalho e que injustamente não foram citados.

**“Sobre o amor muitos sabem
falar, mas poucos sabem sentir”**

(Alice de Castro Damasceno)

RESUMO

Níveis de imunoglobulinas na saliva de crianças e adolescentes portadores de hepatite autoimune. Juliana Ximenes Damasceno. Orientadora: Dra. Cristiane Sá Roriz Fonteles. Coorientadora: Dra. Christiane Araujo Chaves Leite. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós- Graduação em Odontologia. Departamento de Clínica Odontológica, UFC, 2012.

A hepatite autoimune (HAI) é uma doença inflamatória crônica do fígado, de etiologia desconhecida, que acomete preferencialmente mulheres, com destruição progressiva do parênquima hepático e que, sem tratamento imunossupressor, evolui frequentemente para cirrose. Consiste em uma doença rara na infância, com menos de 10% dos pacientes com doença hepática crônica, porém de alta mortalidade. Caracteriza-se pela presença de hipergamaglobulinemia, autoanticorpos não órgãos - específicos e infiltrado inflamatório portal linfoplasmocitário. O uso da saliva como um método de diagnóstico avançou exponencialmente nos últimos anos. Desequilíbrios na quantidade e qualidade da saliva podem tanto gerar afecções bucais quanto ser indicativo de alguma alteração sistêmica importante. Este trabalho objetivou estudar parâmetros de imunoglobulinas salivares e saliva total humana em pacientes portadores de hepatite autoimune. A amostra consistiu em doze indivíduos com HAI (grupo experimental) e doze indivíduos sadios (grupo controle), tendo sido avaliado o fluxo salivar, pH, níveis de imunoglobulinas e perfil proteico. Saliva total não estimulada foi coletada e centrifugada; o sobrenadante foi retido, liofilizado, armazenado a -80°C e analisado para contagem de proteínas totais, eletroforese unidimensional e ELISA. Foi possível detectar diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ($p \leq 0,05$) para os parâmetros salivares analisados. Quando comparados com o grupo controle, portadores de hepatite autoimune apresentaram aumento no número de imunoglobulinas IgG e bandas proteicas com expressão diferenciada. Os resultados deste estudo sugerem haver padrões diferenciados na composição salivar entre os grupos avaliados.

Palavras-chave: Hepatite autoimune. Saliva. Imunoglobulinas. Proteínas salivares.

ABSTRACT

Salivary immunoglobulin levels in children and adolescents with autoimmune hepatitis.

Juliana Ximenes Damasceno. Master Advisor: Dra. Cristiane Sá Roriz Fonteles. Co Master Advisor: Dra. Christiane Araujo Chaves Leite. Master's Dissertation. Postgraduate Program in Dentistry. Department of Dental Clinic, UFC, 2012.

Autoimmune hepatitis (AIH) is an inflammatory chronic liver disease of unknown etiology found predominantly in females, leading when untreated, to cirrhosis. It is a rare disease in the childhood, corresponding to about 10% of patients with chronic hepatitis, but exhibits high mortality. It is characterized by hipergamma globulinemia, organ nonspecific circulating autoantibodies, and an inflammatory liver-infiltrating lymphocytes and plasma cells. The use of saliva as a diagnostic tool has advanced exponentially within recent years. Unbalance in the amount and composition of saliva may generate oral diseases and may also indicate important systemic alterations. This study has aimed to investigate the parameters of immunoglobulins and human whole saliva in patients with AIH. Our study sample consisted of 12 individuals with AIH (experimental group) and 12 healthy individuals without AIH (control group). Salivary flow rate, Ph, immunoglobulins and protein profile were evaluated in this population. Non stimulated whole saliva was collected and centrifuged. The supernatant was separated and lyophilized and stored at -80°C for posterior total protein, unidimensional electroforetic analysis and ELISA. Statistically significant differences were observed between groups ($p \leq 0,05$) for the analyzed salivary parameters. When compared to the control group, individuals with HAI presented elevated IgG level and protein bands with specific expression. The results of this study suggest the existence of important differences within the pattern of salivary protein composition between groups.

Keywords: Autoimmune Hepatitis. Saliva. Immunoglobulins. Salivary proteins.

LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS

FIGURA 1 Hepatite por interface.....	29
FIGURA 2 Rosetas	29
FIGURA 3 Coleta de saliva realizada na clínica de Odontopediatria da UFC.....	62
FIGURA 4 Acessórios utilizados durante a coleta de saliva.....	62
FIGURA 5 Procedimentos realizados antes da liofilização.....	63
FIGURA 6 Equipamento de leitura do ELISA.....	66
FIGURA 7 Equipamento para dosagem de proteína	67
FIGURA 8 Procedimentos realizados durante eletroforese.....	69
FIGURA 9 Coração do gel de eletroforese.....	70
FIGURA 10 Gel de Poliacrilamida a 15% (SDS-PAGE).....	74
FIGURA 11 Membranas de nitrocelulose após <i>Western Blotting</i>	75
FIGURA 12 Placas de ELISA reveladas.....	75
GRÁFICO 1 Valores médios do pH em saliva.....	72
GRÁFICO 2 Média do fluxo salivar não estimulado.....	73
GRÁFICO 3 Média da concentração total de proteínas em ambos os grupos.....	73

LISTA DE TABELAS

1. Critérios diagnósticos da HAI	31
2. Sistema de pontuação para o diagnóstico de HAI, revistos em 1998.....	32
3. Idade e distribuição dos pacientes por condição de saúde	71
4. Distribuição dos pacientes por gênero e condição de saúde.....	71
5. Características biométricas.....	72
6. Distribuição dos pacientes em função da presença ou ausência da expressão de bandas proteicas com diferentes pesos moleculares.....	74
7. Análise da correlação entre as medidas em duplicatas de cada imunoglobulina.....	76
8. Distribuição, valores médios e desvio padrão das concentrações expressas em absorvância de cada imunoglobulina. Valores expressos em duplicatas.....	77
9. Lista das proteínas salivares com peso molecular na faixa de 20,1 a 14,4 kDa.....	102
10. Lista das proteínas salivares com peso molecular em torno de 14,4 kDa.....	108

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AAACF-1	Anticorpo Antiantígeno Citosólico do Fígado
AAHHS	Anticorpo Antiantígeno Hepático Solúvel
AAMFR	Anticorpo Antimicrosomal Fígado Rim
AAML	Anticorpo Antimúsculo Liso
AAN	Anticorpo Antinuclear
AASGPR	Receptor Asialoglicoproteína Hepático
ALT	Aminotransferases
AST	Aminotransferases
BSA	Albumina Sérica Bovina
C4A	Fator do sistema de complemento
C4B	Fator do sistema de complemento
C2	Fator do sistema de complemento
CA15-3	Antígeno para Câncer
CBP	Cirrose Biliar Primária
CD44	Família de Isoformas
CEP	Colangite Esclerosante Primária
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
C-erbB-2	Oncogene
CPT	Concentração de Proteínas Totais Salivares
CYP2D6	Antígeno Recombinante da Isoenzima do Citocromo P450
DAF	Doenças Autoimunes do Fígado
DNA	Ácido Desorribonucleico
EBV	Vírus Epstein- Barr
ELISA	Ensaio com Imunoadsorvente Ligado à Enzima
FFOE	Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem
HAI	Hepatite Autoimune
HBsAg	Antígeno de Superfície do Vírus da Hepatite B
HCA	Hepatite Crônica Ativa
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HLA DR3	Antígeno de Histocompatibilidade
HLA DR4	Antígeno de Histocompatibilidade

IgA	Imunoglobulina A
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
KDa	Quilo Dalton
LC1	Antígeno Citosólico Específico do Fígado
LP	Antígeno Fígado Pâncreas
MHC	Complexo Principal Maior de Histocompatibilidade
pANCA	Anticorpos Antineutrófilos Citoplasmáticos Circulantes de Coloração Perinuclear
pANNA	Anticorpos Antineutrófilos Nucleares Periféricos
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
SAB	Síndrome da Ardência Bucal
SLA	Antígeno Solúvel Hepático
SDS PAGE	Poliacrilamida Duodecil Sulfato de Sódio
STH	Saliva Total Humana
TCA	Ácido Tricloroacético
UECE	Universidade Estadual do Ceará
UFC	Universidade Federal do Ceará
VHA	Vírus da Hepatite A
VHB	Vírus da Hepatite B
VHC	Vírus da Hepatite C
VMN	Valor Máximo de Normalidade
g/Dl	Grama/ decilitro
M	Molar
mA	Miliampere
mg/kg	Miligrama/quilograma
mg/dia	Miligrama/ dia
mg/kg/dia	Miligrama/ quilograma/dia
ml	Mililitro
ml/min	Mililitro/minuto
mM	Milimolar
nm	Nanômetro
rpm	Rotações por Minuto

L

Microlitro

m

Micrômetro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1 Doenças Autoimunes do fígado	20
2.2 Hepatite Autoimune	21
2.2.1 Histórico	21
2.2.2 Epidemiologia	22
2.2.3 Classificação	25
2.2.4 Achados clínicos, laboratoriais e histológicos.....	27
2.2.5 Diagnóstico.....	29
2.2.6 Auto- Anticorpos	33
2.2.7 Genética	34
2.2.8 Patogênese	35
2.2.9 Tratamento	36
2.3 Saliva	41
2.3.1 Composição salivar	43
2.3.2 Função	45
2.3.3 Saliva como Meio Diagnóstico.....	48
2.3.4 Uso da saliva para detecção de doenças.....	50
2.3.4.1 Doenças com desenvolvimento de agentes biológicos infecciosos	50
2.3.4.2 Doenças neoplásicas malignas	52
2.3.4.3 Doenças psiquátricas	53
2.3.4.4 Doenças autoimunes	54
2.3.4.5 Endocrinologia	54
2.3.4.6 Uso da saliva para monitoramento de drogas.....	55
2.4 Relevância do uso da saliva como meio diagnóstico	55
3 OBJETIVOS	57
3.1 Objetivo Geral	57
3.2 Objetivos Específicos	57
4 MATERIAIS E MÉTODOS	58
4.1 Aspectos Éticos	58
4.2 Protocolo Clínico	58

4.2.1 Desenho	58
4.2.2 Examinadores	58
4.2.3 Amostra	59
4.2.4 Critérios de Inclusão dos Participantes	59
4.2.5 Critérios de Exclusão dos Participantes	59
4.2.6 Entrada do Voluntário no Estudo	60
4.2.7 Anamnese.....	60
4.2.8 Exame Dentário	60
4.2.9 Coleta de Saliva	61
4.3 Protocolo Analítico	63
4.3.1 Transporte e Armazenagem da Saliva	63
4.3.2 Mensuração do fluxo salivar	64
4.3.3 Mensuração do pH	65
4.3.4 Análise quantitativa das imunoglobulinas	65
4.3.5 Análise qualitativa das imunoglobulinas.....	66
4.3.6 Análise das proteínas salivares.....	67
4.3.6.1 Dosagem de proteínas pelo Método de Bradford.....	67
4.3.6.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS e betamercaptoeta...	68
4.4 Análise Estatística	70
5 RESULTADOS	71
6 DISCUSSÃO	78
7 CONCLUSÃO.....	84
REFERÊNCIAS.....	85
APÊNDICES	97
ANEXO	101

1 INTRODUÇÃO

A hepatite autoimune (HAI) é uma doença inflamatória do fígado, de origem desconhecida, que causa uma destruição progressiva do parênquima hepático, podendo evoluir para a cirrose e insuficiência hepática, caso o tratamento imunossupressor não seja instituído precocemente (GARCÍA *et al.*, 2007). A sua patogênese é dirigida por um distúrbio na imunorregulação em que a susceptibilidade genética individual desempenha o papel de promover a produção de anticorpos em resposta aos antígenos hepatocelulares. Estes anticorpos servem como marcadores da doença, embora o seu papel patogênico e o seu valor para avaliação de acompanhamento permaneçam controversos (EXTREMERA; SALMERÓN, 2007).

Em termos de perfil sorológico, a hepatite autoimune é classificada como HAI tipo-I ou HAI tipo- II. HAI tipo- I é positiva para anticorpos antinucleares (AAN), anticorpos antimúsculo liso (AAML), ou ambos, representando 2/3 dos casos diagnosticados, acometendo crianças e adultos, enquanto HAI tipo-II é positiva para o anticorpo antimicrosomal fígado-rim (AAMFR), oferecendo, normalmente, um prognóstico ruim na medida em que evolui mais rapidamente para cirrose. Também, frequentemente, se apresenta como hepatite fulminante, sobretudo em jovens. A severidade da doença é similar nos dois tipos de hepatite autoimune (VERGANI; MIELI-VERGANI, 2008).

A sintomatologia da HAI mostra-se variável: assintomática, com mudanças nos parâmetros laboratoriais, com sintomas similares ao da hepatite viral aguda ou com o padrão de insuficiência hepática progressiva, culminando em casos de hepatite fulminante, com a falência do fígado. A doença deve ser suspeitada e excluída em todas as crianças com sinais e sintomas de doença hepática prolongada ou grave (RAFEEY *et al.*, 2007). Não há um exame específico para o diagnóstico da HAI, o qual é realizado com base em critérios clínicos, achados bioquímicos e histológicos (BELLOMO *et al.*, 2006). Os achados clínicos da HAI são semelhantes em ambos os tipos, e consistem em sinais inespecíficos, como: fadiga, mal-estar, anorexia, prurido e desconforto no quadrante superior do abdômen, exibindo, no curso clínico da doença, períodos de piora e melhora (LEMOS *et al.*, 2007). Em contrapartida, os achados laboratoriais mais frequentes são a hipergamaglobulinemia, com elevados títulos de imunoglobulina G (IgG), a presença de aminotransferases e de autoanticorpos (SCHWARZE *et al.*, 2003). Essa doença não revela características histológicas únicas, sendo, geralmente, semelhante à hepatite crônica, com a presença de necrose periportal e infiltração

linfoplasmocitária. A formação de rosetas hepatocíticas é típica. Em casos avançados, regeneração nodular e / ou fibrose podem ser vistas (BOGDANOS *et al.*, 2008).

A principal estratégia terapêutica é destinada a modificar a evolução natural da doença. O tratamento visa aliviar a sintomatologia, melhorar os parâmetros bioquímicos, reduzir os componentes inflamatórios e a fibrose dos tecidos hepáticos, evitar a evolução da hepatite crônica para a cirrose e, o mais importante, reduzir a mortalidade. Corticosteroides como a prednisona, em combinação com azatioprina, constituem o tratamento de escolha, preconizado pela Associação Americana de Estudo das Doenças Hepáticas. Outros imunossuppressores como a ciclosporina, tacrolimo e micofenolato podem ser indicados nos casos em que a resposta ao tratamento clássico é precária ou em casos nos quais o tratamento clássico induz efeitos colaterais adversos (BERSANI *et al.*, 2008).

No Brasil, a hepatite autoimune acomete cerca de 5 a 10% das doenças hepáticas nos principais centros de gastroenterologia do país. Na infância, corresponde a cerca de 10% dos pacientes com doença hepática crônica (PORTA, 2000). Apesar de haver poucos estudos a respeito do referido tema, a HAI é uma causa importante de doenças crônicas no fígado nessa faixa etária (VERGANI; MIELI, 2008). É importante salientar que a história natural da HAI é mais agressiva em crianças que em adultos, a sua recorrência após o transplante é mais comum entre crianças, bem como uma menor resposta à terapia medicamentosa (EXTREMERA; SALMERÓN, 2007) e a sobrevivência de pacientes com HAI que se manifestou durante a faixa etária pediátrica é menos favorável (CELLI, 2005), enfatizando a necessidade de um diagnóstico precoce para essa doença.

A saliva consiste em uma secreção exócrina complexa de fundamental importância para a manutenção da homeostase da cavidade bucal (EDGAR, 1990), em sua composição existe um grande número de proteínas que participam da proteção dos tecidos orais, como a lisozima, a lactoferrina, a lactoperoxidase, as imunoglobulinas, as aglutininas e as mucinas (YAO *et al.*, 2003). A exploração dos componentes salivares é de extrema relevância, uma vez que pode levar ao desenvolvimento de maneiras de aumentar sua expressão, desde a utilização desses componentes de forma terapêutica a um teste simples para avaliar o risco de doenças sistêmicas. A análise da mesma identifica indivíduos com certas doenças e acompanha o progresso do indivíduo afetado, durante o tratamento (STRECKFUS; BIGLER, 2002).

Nos últimos dez anos, o uso da saliva como método de diagnóstico avançou rapidamente, por tratar-se de um método não invasivo, relativamente fácil de ser realizado, apresentando vantagens tanto para o profissional da saúde quanto para o paciente

(STRECKFUS; BIGLER, 2002). Atualmente, há, entretanto, a compreensão de que quase tudo que se pode medir no sangue é mensurável em saliva (WONG, 2006). Tendo já sido demonstrada a presença de um grande número de dados analíticos diagnósticos em saliva, incluindo hormônios esteroides (FORDE *et al.*, 2006), anticorpos anti-HIV, hepatites virais A, B e C, além de seu uso para monitoramento dos níveis de uma variedade de drogas (MANDEL, 1990).

Apesar da significância dos achados laboratoriais, em pacientes portadores desta condição, nenhum estudo de avaliação de parâmetros salivares foi previamente realizado em pacientes portadores de HAI, não havendo, portanto, nenhum dado na literatura mundial que possa servir como base para avaliação de uma possível correlação entre a disfunção preexistente nesses pacientes e a composição qualitativa e quantitativa de sua saliva.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Doenças Autoimunes do Fígado

As doenças autoimunes foram reconhecidas durante a década de 1950 como entidades patogênicas em seres humanos e animais. Na atualidade, existem cerca de 80 condições distintas relacionadas à autoimunidade. Entre elas, as doenças autoimunes do fígado (DAF) foram as primeiras entidades de doenças autoimunes reconhecidas. A partir desse reconhecimento, a consciência clínica sobre DAF vem aumentando, o conhecimento da sua etiopatogenia tornou-se mais preciso e encontram-se disponíveis um arsenal de biomarcadores laboratoriais e terapias mais eficazes. Embora apresente uma baixa prevalência, o impacto desses transtornos na saúde ainda é muito substancial, uma vez que as DAF podem afetar crianças, indivíduos em estágios altamente produtivos da vida adulta, assim como em anos posteriores. Além disso, as DAF ocorrem ao longo da vida e, muitas vezes, causam sintomas aflitivos, complicações ou efeitos colaterais da terapia (INVERNIZZI; MACKAY, 2008). De forma semelhante a outras doenças autoimunes, a etiologia das DAF é desconhecida. Acredita-se que a patogênese da DAF é multifatorial, com fatores ambientais e genéticos interagindo para determinar o início e a progressão da doença (DAVIES, 2008).

As doenças hepáticas autoimunes consistem em processos crônicos inflamatórios nos quais um ataque imunológico proporcionado por uma falha do sistema imunológico em reconhecer as diferenças entre os antígenos no organismo é direcionado contra as células hepáticas. Essas doenças podem ser classificadas em duas principais entidades, de acordo com a célula alvo da lesão imunológica, ou seja, hepatócitos e colangiócitos. Essa desordem imunológica resulta em destruição dos tecidos e dos órgãos. Há pelo menos três desordens clínicas, conhecidas como hepatite autoimune (HAI), cirrose biliar primária (CBP) e colangite esclerosante primária (CEP), envolvidas nessa categoria (INVERNIZZI, 2010).

O início da DAF se mostra enigmático, com uma progressão lenta, podendo evoluir para uma cirrose hepática. O seu diagnóstico requer a exclusão de outras causas de danos ao fígado, como danos virais, tóxicos, alcoólicos, genéticos, metabólicos ou de doenças não alcoólicas do fígado, em conjunção com uma avaliação dos achados clínicos, bioquímicos, histológicos e colangiográficos específicos para cada uma das entidades de DAF. Embora a

maioria dos critérios diagnósticos individualmente apresentem sensibilidade e especificidade limitadas, as combinações de recursos de diagnóstico apresentam alta sensibilidade e especificidade. Os autoanticorpos séricos desempenham um papel importante no diagnóstico e podem permitir a identificação de subgrupos de pacientes com prognósticos diferentes (PLEBANI *et al.*, 2009).

2.2 Hepatite Autoimune

2.2.1 Histórico

Desde o seu primeiro relato em mulheres jovens, a hepatite autoimune (HAI) tem sido considerada um grande desafio para os estudiosos da área da saúde. Foi primeiramente descrita em 1950 por um médico sueco chamado Waldenström, que descreveu uma série de casos de mulheres jovens com uma forma severa de hepatite persistente, flutuante, associada a erupções acneiformes, amenorreia e um aumento acentuado nas concentrações de globulinas séricas. Embora Waldenström seja creditado pela primeira descrição da desordem conhecida atualmente como HAI, relatos similares apareceram anteriormente na Austrália, Estados Unidos da América e Reino Unido (MANNNS, 1997). Naquela época, acreditava-se que a doença era oriunda de uma infecção viral persistente e, por isso, foi denominada hepatite viral crônica ativa. Posteriormente, com o aumento da evidência de que essa condição parecia ter por base a perda da tolerância imunológica, passou a ser reconhecida como lupoide ou hepatite crônica ativa autoimune. Esses termos continuaram a ser usados, muitas vezes de forma intercambiável, até o final da década de 1980.

Inicialmente, a síndrome foi descrita como uma condição agressiva que rapidamente progredia para cirrose, com os primeiros relatos documentando taxas de mortalidade de até 80% dentro de cinco anos do diagnóstico em pacientes não tratados. Contudo, ensaios clínicos, no final da década de 1960 e início da década de 1970, mostraram que a doença pode ser controlada através de terapia imunossupressora, na maioria dos pacientes (HENEGHAN; MCFARLANE, 2002). O quadro histológico característico assemelha-se ao da hepatite crônica ativa (HCA), mostrando uma infiltração linfoplasmocitária portal e periportal, com rompimento da parede limitante e que Popper *et al.* (1965) descreveram como

"necrose fragmentária de hepatócitos da região periportal, uma característica que posteriormente foi considerada como o marco de HCA. Durante muitos anos, a síndrome foi incluída na categoria ampla de HCA, com a subdivisão HBsAg negativo, idiopática, criptogênica ou, ocasionalmente, HCA não-A, não-B ou que reagem a esteroides.

Apenas em 1992, dois grupos de trabalhos internacionais padronizaram a definição e os critérios diagnósticos da hepatite autoimune crônica ativa, com a finalidade de aprimorar a comparação dos estudos em nível mundial (JOHNSON; MCFARLANE, 1993). O primeiro encontro aconteceu em Brighton, Reino Unido, em 1992, e o segundo em Los Angeles, Califórnia, em 1994, durante o Congresso Mundial de Gastroenterologia. Ambos recomendaram que o uso do termo crônica ativa fosse interrompido e que a síndrome passasse a ser conhecida como hepatite autoimune (HAI). A justificativa para essa recomendação surgiu do reconhecimento de que a doença demonstra ter uma predisposição genética e, portanto, apresenta-se como uma condição crônica, flutuante, que na maioria das vezes entra em períodos de remissão induzida pelo tratamento ou espontaneamente, não sendo, portanto, sempre ativa.

A hepatite autoimune (HAI), atualmente, pertence ao quadro das doenças autoimune do fígado e consiste em uma doença crônica inflamatória progressiva, desencadeada por fatores ainda desconhecidos e afeta indivíduos que aparentemente perderam a tolerância imunológica a certos antígenos específicos do fígado. Atinge principalmente os hepatócitos, ocasionando uma lesão no parênquima hepático, e que pode originar danos celulares irreversíveis. Acomete, na maioria das vezes, pacientes jovens, do sexo feminino, e se caracteriza pela presença de hipergamaglobulinemia (principalmente elevados níveis de IgG), associação com outras desordens autoimune, antígenos de histocompatibilidade, autoanticorpos, alterações histológicas como a presença de hepatite de interface e infiltrado celular inflamatório e resposta terapêutica ao tratamento com corticosteroides (CZAJA, 1984).

2.2.2 Epidemiologia

A confiabilidade dos estudos epidemiológicos depende do correto diagnóstico da doença a ser estudada e da análise exata do seu momento de início. A sensibilidade e a especificidade do critério de diagnóstico oferecem o alicerce para um trabalho de diagnóstico

confiável. A história natural da doença expressa o espaço de tempo entre os períodos do seu verdadeiro início e de sua detecção clínica. Os achados clínicos ou testes laboratoriais disponíveis específicos para a hepatite autoimune (HAI), ainda não foram totalmente elucidados. Da mesma forma, as estimativas de início da doença confundem-se pela baixa frequência e pelo seu possível comportamento subclínico (ALVAREZ *et al.*, 1999; JOHNSON; MCFARLANE, 1993). Cada um desses fatores interferem nos esforços para a determinação da sua epidemiologia.

O sistema de pontuação desenvolvido para o diagnóstico da HAI proposto pelo grupo Internacional de Hepatite Autoimune tem sido muito importante na distinção dos casos atípicos da doença e em quantificar o potencial de diagnóstico (ALVAREZ *et al.*, 1999; JOHNSON; MCFARLANE, 1993; CZAJA, 1998). Esse sistema foi validado em alguns estudos e sua utilização confere uma base uniforme para o diagnóstico da hepatite autoimune (CZAJA, 1996). Quando aplicados de forma rigorosa e universal, os critérios de diagnósticos, por sua vez, garantem uma base de informações mais confiáveis para posteriores estudos epidemiológicos.

Embora estudos epidemiológicos na HAI apresentem pouca frequência, observações de algumas regiões revelam evidências de uma diversidade geográfica na prevalência e características dessa doença. A ocorrência de certos autoanticorpos também diverge de acordo com a região, e existe uma heterogeneidade na associação de genes HLA entre os grupos étnicos (MCFARLANE, 1998; CZAJA; DONALDSON, 2000; CZAJA *et al.*, 2000).

Nas primeiras observações sobre a prevalência da HAI, a doença apresentava-se dentro do espectro das hepatites crônicas ativas (HCA), que abrangiam lesões hepáticas inflamatórias e fibróticas de diversas etiologias (BATTS; LUDWIG, 1995). Os escassos estudos epidemiológicos realizados foram baseados principalmente na população do norte europeu. Entre 404.000 habitantes em Southampton, na Inglaterra, a incidência anual de HCA foi de 3/100.000 habitantes, entre 1976 a 1980. A HAI consistiu em 23% de todos os casos com uma incidência de 0,69/100.000 habitantes/ano (HODGES *et al.*, 1982).

Em um estudo epidemiológico conduzido na Islândia, no período de 1970 e 1979, foi estimada uma incidência anual de 0,83/100.000 habitantes e uma prevalência de 8/100.000 habitantes de 1977 a 1979 (BJARNASON *et al.*, 1982). Em uma pesquisa norueguesa, ocorrida em 1981, a incidência de HAI foi 1,19/100.000 habitantes (RITLAND, 1985). Um levantamento britânico realizado durante 1971 a 1987, tendo como base uma população de 210.000 habitantes, constatou uma incidência anual de HCA de 1/100.000 habitantes onde 77% dos casos apresentavam uma etiologia autoimune, estabelecendo uma incidência de

0,8/100.000 habitantes/ano (TANNER; DELLIPIANI, 1989). Esses índices assemelham-se ao observado em aproximadamente um terço dos habitantes suecos, no período de 1979 e 1985. A incidência anual de HCA nesse país foi de 1,6/100.000 habitantes com o grupo de pacientes portadores de HAI consistiu em cerca 53% da população, o que constou uma incidência anual de 0,8/100.000 habitantes (OLSSON *et al.*, 1988). Em resumo, as epidemiologias estimam a incidência da HAI no norte europeu na faixa entre 0,7 a 1,2/100.000 habitantes/ ano.

Em diversas regiões geográficas, a proporção de HAI entre os casos de HCA divergem. Todavia, geralmente, a quantidade de casos da HAI mostra-se reduzido em localidades que apresentam elevada prevalência de hepatites virais. Como exemplo, em Hong Kong, cuja prevalência de infecções crônicas virais encontra-se elevada, HAI consistiu em 1% da totalidade do grupo de pacientes portadores de HCA (LAM *et al.*, 1980). A frequência da HAI no país é inferior a 5% de todos os casos de HCA (TODA *et al.*, 1997). Em contrapartida, HAI representa aproximadamente 20% dos casos de HCA nos habitantes brancos do norte da Europa e da América do Norte, onde a infecção viral é relativamente baixa (MANNIS; STRASSBURG, 2001). Já, na Austrália, HAI é responsável por 62% dos casos de HCA (MACKAY; MORRIS, 1972). No Brasil, representa apenas 5% a 10% dos casos hepáticos nos principais centros médicos (CANCADO; PORTA, 2002). É importante enfatizar que todas as estimativas das frequências absolutas ou relativas da HAI dependem da confiabilidade dos critérios de diagnósticos que não tinham sido padronizados no momento dos estudos mencionados acima.

Recentemente, a epidemiologia da HAI tem sido relacionada com a epidemiologia da cirrose biliar primária e da colangite esclerosante primária pela natureza autoimune. Nishioka *et al.* reuniram índices da incidência da HAI em países como Inglaterra, França, Áustria e Japão. A incidência por 100.000 habitantes/ano da HAI foi 0,1 a 0,2; na Inglaterra, 0,12; na França, 1,2; na Austria e 0,0015 a 0,08 no Japão. Estudos epidemiológicos noruegueses descrevem uma incidência média anual de 1,9 por 100.000 habitantes para HAI (BORBERG *et al.*, 1998). Os achados, para os países do norte europeu caracterizaram-se mais baixos quando comparados àqueles estabelecidos por estudos anteriores, provavelmente devido à evolução dos critérios diagnósticos e os ensaios para as infecções virais.

2.2.3 Classificação

Observa-se uma considerável inconstância entre os pacientes portadores de HAI referente ao modo de apresentação, a severidade da doença e a resposta ao tratamento. Por essa razão, as tentativas de classificar HAI não apenas com o propósito do diagnóstico, mas também com a intenção de contribuir nas pesquisas foram realizadas ao longo dos anos para a obtenção de uma acurada definição do prognóstico e das estratégias de planejamento do tratamento.

Homberg *et al.* (1987) atentaram que grande parte dos pacientes que possuíam o anticorpo antimicrosomal fígado/rim tipo I (AAMFR) consistia de jovens do sexo feminino, com doença grave, que na maioria das vezes não apresentavam os anticorpos antinuclear (AAN) e antimúsculo liso (AAML) e mostravam um número mais frequente de distúrbios imunológicos extra - hepáticos quando comparadas aos pacientes que possuíam AAN ou AAML. Eles insinuaram que a aparente exclusão mútua do AAMFR e dos outros autoanticorpos em conjunção com as divergências existentes no quadro clínico legitimava a subdivisão dos casos de HAI em tipo I (AAN/ AAML positivo) e tipo 2 (AAMFR positivo).

Manns *et al.* (1987) descreveram a descoberta de um novo autoanticorpo, nomeado anticorpo antiantígeno hepático solúvel (AAHS), aparentemente específico da HAI. Eles entenderam que, embora o AAHS aparecesse em aproximadamente 30% dos pacientes, esse anticorpo poderia ser encontrado nos pacientes que não apresentavam os autoanticorpos convencionais, e propuseram que esses casos deveriam ser classificados HAI tipo 3.

Posteriormente a descoberta de uma associação entre a presença do AAMFR e a infecção por VHC, no sul da Europa, (LUNEL *et al.*, 1992), Homberg *et al.* propuseram que o tipo II da HAI fosse dividido em tipo IIa, que enquadrava mulheres jovens com doença severa, títulos elevados de AAMFR e ausência de infecção por VHC; e tipo IIb, que engloba homens adultos, portadores de baixos títulos de AAMFR e infecção por VHC. Eles sugeriram que outro autoanticorpo, denominado antiantígeno citosólico do fígado tipo 1 (AAACF-1), discriminaria esses dois novos subtipos de HAI. Entretanto, esta proposta foi posteriormente contestada (LENZI *et al.*, 1995). Paralelamente também houve outras sugestões para a classificação da HAI tomando como base o perfil de autoanticorpos, mas que não foram aprovadas (MCFARLANE, 1998).

Portanto, firmado na presença dos marcadores sorológicos classifica-se a HAI em três tipos: o tipo I consiste na forma mais comum da doença em todo o mundo, correspondendo a

80% dos casos. Caracteriza-se pela presença no soro de anticorpos antimúsculo liso e/ ou anticorpos antinuclear, hipergamaglobulinemia, ocorre predominantemente no sexo feminino, apresenta uma distribuição etária bimodal (dos 10 aos 20 anos e dos 45 aos 70 anos) e uma elevada concomitância com doenças imunológicas extra – hepáticas. O tipo II, por sua vez, caracteriza-se pela presença de anticorpos antimicrosossomais fígado/rim tipo I. Acomete principalmente crianças do sexo feminino, na faixa etária de 2 a 14 anos, possui um prognóstico menos favorável com uma apresentação fulminante mais frequente bem como uma maior progressão à cirrose, quando comparado com o tipo I. A associação com doenças autoimunes extra- hepáticas também ocorre. O tipo III caracteriza-se pela presença do anticorpo antiantígeno hepático solúvel. Usualmente, não é detectada a presença de AAN ou AAMFR, embora o AAML possa estar presente. Acomete, preferencialmente, adultos do sexo feminino, na faixa etária de 30 a 50 anos, sendo também frequente a concomitância de outras doenças autoimunes (CZAJA, 2001).

A HAI tipo III é clinicamente indistinguível da doença do tipo I, porém, o principal problema em fazer uma distinção clínica entre o tipo I e tipo II é que essa classificação não é exclusiva. A idade de apresentação é um fator importante. Como mencionado acima, pacientes mais jovens (menos de 30 anos de idade), geralmente têm uma doença mais grave, que pode ser de difícil controle, enquanto os pacientes mais velhos geralmente tendem a ter uma forma mais branda, que responde mais rapidamente e de forma satisfatória à terapia imunossupressora. Embora os pacientes com HAI tipo II sejam quase todos jovens do sexo feminino com doença grave, eles representam apenas uma proporção muito pequena dos casos de HAI, e a grande maioria de mulheres jovens com doença grave apresenta HAI do tipo I. Embora existam algumas diferenças quanto aos aspectos clínicos, laboratoriais e aos achados histológicos entre o tipo I e o tipo II da HAI, os pacientes jovens de ambos os tipos são semelhantes no que diz respeito à gravidade, à resposta ao tratamento e aos resultados em longo prazo (GREGORIO *et al.*, 1997).

Embora apenas a subdivisão em tipo I e tipo II tenha recebido grande aceitação, ainda persistem algumas dificuldades clínicas para aprovação dessa classificação (CZAJA; MANNS, 1995). Evidências sugerem que os tipos I e II da doença sejam dois subgrupos patogenticamente distintos (BITTENCOURT *et al.*, 1999) e, após a clonagem do antígeno SLA / LP, tem sido sugerido que a definição de HAI tipo III com base na positividade anti-SLA/LP também poderia ser justificável em termos patogénicos (MCFARLANE, 2000). Portanto, esse tipo de classificação pode ser útil para trabalhos de pesquisas, entretanto, parece ter pouca utilidade do ponto de vista clínico.

Uma classificação que pode ser mais útil clinicamente, mas que ainda não foi formalmente adotada, baseia-se na associação da HAI com a herança dos alótipos HLA DR3 ou DR4. Esses marcadores consistem em fatores de risco independentes para HAI e associados a diferentes expressões clínicas da doença (DONALDSON *et al.*, 1991). Pacientes portadores do alótipo DR3, geralmente apresentam uma doença mais severa, uma remissão induzida pelo tratamento menos efetiva, recaídas mais frequentes e, em geral, prognósticos menos favoráveis (MCFARLANE,1998; CZAJA; MANNS,1995). Em contrapartida, pacientes portadores do alótipo DR4 tendem a apresentar uma idade mais avançada, doença moderada e desenvolver uma resposta mais rápida e completa ao tratamento imunossupressor em comparação ao pacientes que possuem o alótipo DR3 (TODA *et al.*,1997; CZAJA *et al.*, 1993). Concentrações séricas de C4 também podem ser úteis ao prognóstico, uma vez que foi observado que pacientes com HAI apresentam frequentemente baixos níveis de C4. Isso está associado à herança de um alelo nulo no locus C4A, à alta frequência de recaídas e ao aumento da mortalidade. Contudo, essa classificação também ainda não foi formalmente incorporada a um sistema de classificação (VERGANI *et al.*, 1985; DOHERTY *et al.*, 1994).

2.2.4 Achados clínicos, laboratoriais e histológicos

Alguns pacientes demonstram um início abrupto, indistinguível de um quadro de hepatite viral, apresentando os sintomas compatíveis com uma hepatite aguda. Outros, no entanto, desenvolvem o quadro de maneira insidiosa. Raramente os pacientes são assintomáticos, podendo a doença permanecer sem exteriorização clínica por meses ou anos, sendo então detectada em uma avaliação de rotina por um achado acidental de alterações dos exames bioquímicos de função hepática.

Um estudo realizado em 111 crianças e adolescentes com HAI no Instituto da Criança Professor Pedro Alcântara mostrou um início abrupto da doença em 89% dos casos, insidioso em 11%. (PORTA *et al.*, 1990).

Em alguns casos, a forma de apresentação mostra-se fulminante e, em geral, ocorre na HAI do tipo II. O curso da doença pode ser persistente ou recorrente. Não há diferenças quanto aos sintomas entre os vários tipos de HAI. Entretanto, como já mencionado anteriormente, o tipo II ocorre mais frequentemente em idades mais precoces do que o tipo I.

As manifestações, em regra, refletem um processo inflamatório crônico hepático, sendo os sintomas mais frequentes, a fadiga e a icterícia. Alguns casos podem se manifestar desde o início, com sinais de descompensação da doença hepática já avançada, como: ascite, sangramentos gastrointestinais, encefalopatia hepática, chegando ao coma. Graus variados de hipertensão portal e história de hemorragia digestiva podem ocorrer desde o início, dependendo do tempo de duração da doença. Ao exame físico, hepatomegalia é o achado mais comum, está presente em 78% dos casos; e a esplenomegalia pode ser detectada na presença ou na ausência de cirrose, assim como a constatação de aranhas vasculares (MATTOS *et al.*, 2001). Pode haver manifestações extra – hepáticas associadas, como: acne, pápulas inflamatórias, estrias gravídicas, paniculite de Weber, artrite, artralgia, albuminúria, anastomoses arteriovenosas pulmonares, alveolite fibrosante, poliarterite nodosa, fâcies cushingóide, ginecomastia em meninos, a amenorreia em mulheres, tireoidite, diabetes mellitus tipo I, anemia hemolítica autoimune, iridociclite. Uma complicação rara é o carcinoma hepatocelular (PORTA, 2000).

Os achados laboratoriais mais característicos abrangem elevada atividade sérica das transaminases, podendo chegar a níveis de uma hepatite aguda, elevada concentração de bilirrubina, com níveis séricos de fosfatase alcalina normais ou moderadamente elevados, e hipergamaglobulinemia (MCFARLANE, 2002). Os níveis de gama- glutamiltranspeptidase podem estar também aumentados, porém em níveis menores que as transaminases. Quando houver perda de função hepatocelular, esta pode ser revelada pelos níveis de albumina diminuídos assim como pelo tempo de protrombina prolongado. A gamaglobulinemia está aumentada na maioria dos pacientes com níveis superiores a 2 g/dL. A hipergamaglobulinemia na HAI é policlonal, com um predomínio de IgG. Os valores de IgG estão quase sempre elevados, sendo muito maiores na HAI tipo I; níveis baixos de IgA são encontrados particularmente na HAI tipo II, valores muito maiores de IgM na HAI-1. A anemia pode ser discreta, em geral hipocrômica microcítica, a não ser quando associada a um processo hemolítico. Leucopenia e trombocitopenia podem ocorrer, em geral, associadas ao hiperesplenismo (MATTOS *et al.*, 2001).

Os padrões de autoanticorpos não órgão - específicos aos componentes internos celulares revelam AAN, AAML e AAMFR, que constituem o repertório convencional de autoanticorpos para essa condição e determinam os dois tipos de hepatite autoimune, que são mutuamente exclusivos. Os autoanticorpos podem desaparecer, em geral, durante o tratamento, ou ainda podem aparecer novos elementos durante o curso da doença, em ambos os tipos de HAI.

A biópsia hepática deve sempre ser realizada, exceto nos casos em que existam alterações de ordem sanguínea que a tornem contraindicada. Ela permite que seja determinada a atividade e o grau de fibrose da doença. A primeira retrata a severidade do processo e a segunda sua progressão, uma vez que nem as transaminases e as gamaglobulinas são capazes de sugerir a presença ou ausência de cirrose hepática, e ajuda a excluir outras causas de doença hepática (MCFARLANE, 2002).

Apesar de não haver achados patognomônicos, os achados histológicos, embora pouco específicos, revelam um infiltrado inflamatório crônico predominante nos espaços portais, periportais e intralobulares, composto por linfócitos, plasmócitos e, às vezes, por polimorfonucleares neutrófilos e eosinófilos, hepatite por interface (Figura 1), regeneração hepática pela formação de rosetas (Figura 2), alargamento dos espaços portais por fibrose, desarranjo da arquitetura lobular com lesões importantes dos hepatócitos, tais como degeneração balonizante, retração, fragmentação, desintegração e necrose, levando à formação de cirrose (PORTA, 2000).

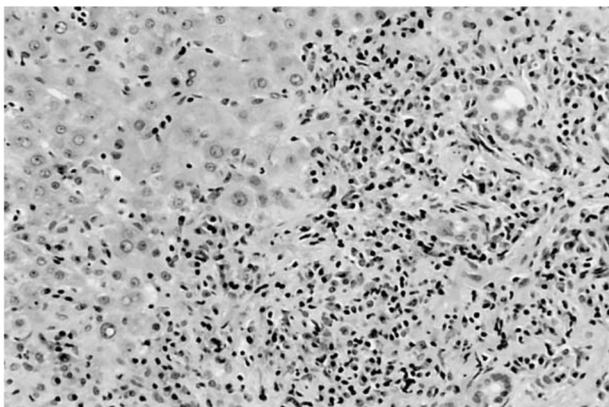


Figura 1- Hepatite por Interface
Fonte: Dávalos, 2004.

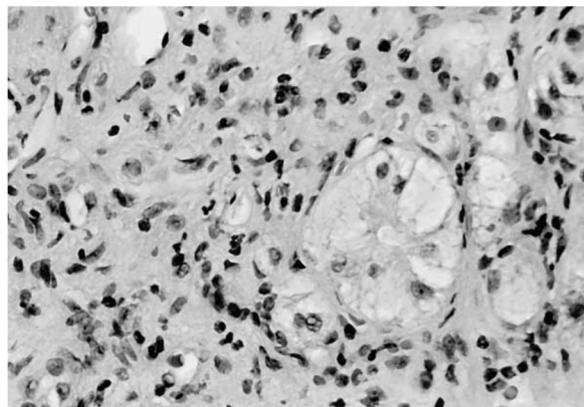


Figura 2 - Rosetas
Fonte: Dávalos, 2004.

2.2.5 Diagnóstico

Como não existem achados específicos para a hepatite autoimune, o diagnóstico requer a combinação de características clínicas, laboratoriais e histológicas, concomitantemente com a exclusão de outras possíveis causas de doenças hepáticas, como as hereditárias (doença de Wilson, deficiência de alfa 1 antitripsina), as infecciosas (hepatites virais), as induzidas por drogas e outras doenças hepáticas autoimunes como a cirrose biliar primária e a colangite esclerosante primária (MCFARLANE, 2002).

Ainda não existe um critério totalmente estabelecido para o diagnóstico da hepatite autoimune. Classicamente, observa-se uma duração das manifestações clínicas por um período superior a 6 meses. Baseia-se na presença de um quadro clínico compatível com hepatite, de evolução variável, com ou sem a presença de outras manifestações extra-hepáticas, ausência de marcadores de infecção como o vírus da hepatite A (VHA), vírus da hepatite B (VHB) e vírus da hepatite C (VHC), elevação de transaminases de 3 a 10 vezes o valor máximo de normalidade (VMN), aumento da gamaglobulina superior a 2 vezes o VMN e titulação elevada de autoanticorpos não órgão - específicos circulantes como AAML, AAN ou AAMFR. Torna-se primordial a exclusão de outros possíveis agentes etiológicos. Em alguns casos, suspeita-se de hepatite autoimune mesmo quando não são observados marcadores imunológicos, hipergamaglobulinemia e haja boa resposta a corticosteroides. Assim, a hipótese de HAI deve ser sempre levada em consideração quando se depara com um paciente do sexo feminino com alteração da função hepática e com presença de outros fenômenos autoimunes bem como quando os mesmos forem observados em familiares de primeiro grau (JOHNSON; MCFARLANE, 1993).

Em 1993, o grupo internacional, encabeçado por Johnson, definiu critérios para uma melhor sistematização e caracterização da doença, tendo em vista sua conveniência na objetivação do diagnóstico. Esses critérios (Tabela 1), entretanto, foram revistos por esse grupo em 1999 (ALVAREZ *et al.*, 1999). Um sistema de escore (Tabela 2) que valoriza critérios clínicos, laboratoriais e histológicos foi proposto, com o intuito de permitir um diagnóstico definitivo ou provável da doença, para elaborar um conjunto de critérios descritivos para os casos difíceis ou quando houvesse a necessidade de uma avaliação mais objetiva e comparar os resultados na literatura. Esse sistema foi validado em um estudo que avaliou 119 pacientes com HAI, onde a sensibilidade e a especificidade do mesmo foram respectivamente de 82 e 98% (CZAJA; CARPENTER, 1996).

De acordo com esse sistema, para o diagnóstico definitivo da HAI, além dos achados de hepatite periportal, hipergamaglobulinemia e a presença de autoanticorpos é preciso haver ausência de marcadores virais, consumo excessivo de álcool, transfusão de sangue, uso de drogas hepatotóxicas, lesão biliar, depósitos de cobre ou alterações histológicas sugestivas de outras etiologias. Por outro lado, um diagnóstico provável é alcançado quando os achados são compatíveis, porém insuficientes para atender aos critérios definitivos. A reavaliação do diagnóstico desses casos é feita após a verificação da resposta clínica ao tratamento terapêutico (JOHNSON; MCFARLANE, 1993).

O diagnóstico da hepatite autoimune deveria ser considerado, a despeito do escore proposto, a qualquer paciente, independentemente do sexo, na presença de doença hepática aguda ou crônica e de testes bioquímicos hepáticos anormais sem sinais e sintomas de outra doença hepática já pesquisada, em especial se houver história de doenças autoimunes no próprio paciente ou em familiares de primeiro grau.

Tabela 1: Critérios Diagnósticos da HAI

Requisitos	Definitivo	Provável
Ausência de hepatopatia genética	Fenótipo normal p/ alfa-1 antitripsina Ceruloplasmina, ferro e ferritina normais.	Deficiência parcial de alfa-1-antitripsina Alterações inespecíficas do cobre sérico, ceruloplasmina, ferro e ferritina.
Ausência de infecção viral ativa	Sem marcadores de infecção atual para hepatites A, B ou C.	Sem marcadores de infecção atual para hepatites A, B ou C
Ausência de lesão hepática por álcool ou drogas	Ingestão alcoólica < 25g/dia e sem uso recente de droga hepatotóxica.	Ingestão alcoólica < 50g/dia e sem uso recente de droga hepatotóxica.
Características laboratoriais	Alteração predominante das aminotransferases Globulina, gama-globulina ou IgG Maior ou igual a 1,5 vezes o normal	Alteração predominante das Aminotransferases Qualquer grau de Hipergamaglobulinemia
Autoanticorpos	AAN, AAML, ou AAMFR maior ou igual a 1:80 em adultos e maior ou igual 1:20 em crianças; Ausência de AMA	AAN, AAML ou AAMFR maior ou igual 1:40 em adultos ou outros autoanticorpos positivos.
Alterações histológicas	Hepatite de interface Ausência de lesão biliar, granulomas, ou achados sugestivos de outra doença.	Hepatite de interface Ausência de lesão biliar, granulomas, ou achados sugestivos de outra doença.

Fonte: Alvarez *et al.* (1999).

Tabela 2: Sistema de pontuação para o diagnóstico de HAI, revistos em 1998*

Parâmetros	Pontuação
Sexo feminino	+2
Fosfatase Alcalina/ AST/(ou) ALT < 1,5 1,5-3,0 > 3,0	+2 0 -2
Globulina Sérica (número de vezes acima do normal) > 2,0 1,5-2,0 1,0-1,5 <1,0	+3 +2 +1 0
Autoanticorpos Adultos AAML, AAN ou AAMFR >1/80 1/80 1/40 <1/40 Anticorpo antimitocôndria positivo	+3 +2 +1 0 -4
História de uso de drogas hepatotóxicas positiva negativa	-4 +1
Utilização de bebidas alcoólicas < 25g/dia > 60g/dia	+2 -2
Marcadores Virais** presentes ausentes	-3 +3
Histologia Hepatite de Interface Infiltrado inflamatório, predominantemente linfoplasmocitário Rosetas Nenhuma das acima Alterações biliares Outras alterações	+3 +1 +1 -5 -3 -3
Outra doença autoimune no paciente ou em familiar de primeiro grau	+2
Resposta Terapêutica Completa Recidiva	+2 +3
Diagnóstico definitivo: antes do tratamento >15 após o tratamento >17 Diagnóstico provável: antes do tratamento 10-15 após o tratamento 12-17	

***Fonte:** Modificado de Alvares *et al.* (1999).

**Anti VHA IgM, HBsAg ou antiHBc IgM positivo; anti VHC e RNA do VHC positivo.

2.2.6 Autoanticorpos

AAN, AAML e AAMFR devem ser identificados em todos os pacientes com achados clínicos, laboratoriais e/ou histológicos compatíveis com o diagnóstico de HAI. Eles constituem o repertório convencional de autoanticorpos para essa condição (ALVAREZ *et al.*, 1999). Quase todos os pacientes portadores de HAI se apresentam com significantes títulos de um ou mais autoanticorpos. Os títulos, muitas vezes, variam durante o curso da doença e podem decrescer ou se tornar negativos com a resposta ao tratamento, mas, em geral, eles não revelam fidedignamente a gravidade da doença (CZAJA, 1999). Eles revelam o potencial da resposta imunológica e são convenientes somente no diagnóstico para complementar outros achados que suportam o diagnóstico da HAI. Eles não promovem a doença e seus níveis não revelam a resposta ao tratamento, portanto, eles não necessitam de monitoramento (BEN ARI; CZAJA, 2001).

Aproximadamente 70 a 80% dos pacientes são soropositivos para os anticorpos antinucleares (AAN) ou anticorpos antimúsculo liso (AAML), ou ambos. Os AAN consistem em marcadores tradicionais da HAI, revelam tipicamente um padrão homogêneo de coloração do núcleo pela imunofluorescência indireta na secção de tecidos ou em células isoladas. A reatividade nuclear também pode ser acessada através de ensaios imunoenzimáticos, usando placas de microtitulação com antígenos adsorvidos recombinantes ou altamente purificados. Outros padrões de coloração também são vistos com frequência, mas padrões diferentes parecem não ter implicações para prática clínica. Reagem contra diversos antígenos nucleares recombinantes, incluindo centrômeros, ribonucleoproteínas e complexos ribonucleoproteicos (CZAJA *et al.*, 1997).

Os AAML também consistem em marcadores padrão da HAI e reagem com uma diversidade de componentes do citoesqueleto, incluindo desmina, vimentina, tubulina e F-actina (CZAJA *et al.*, 1996). Além disso, entre 60 e 90% dos pacientes com HAI possuem autoanticorpos antineutrófilos citoplasmáticos circulantes de coloração perinuclear (pANCA), mais apropriadamente denominados anticorpos antineutrófilos nucleares periféricos (pANNA), pois os antígenos-alvo parecem estar localizados na periferia do núcleo, ao invés do citoplasma. AAN, AAML e pANNA não são específicos para HAI, mas são marcadores úteis que contribuem para o diagnóstico dessa condição.

Uma pequena proporção de pacientes, aproximadamente 3 a 4 %, apresenta anticorpos microsossomais fígado- rim do tipo 1 (AAMFR) que geralmente aparecem na ausência de AAN

e AAML. A seropositividade requer uma reação contra os túbulos proximais do rim e hepatócitos do fígado de murinos, pela imunofluorescência indireta. Eles reagem com uma sequência linear curta do antígeno recombinante CYP2D6 da isoenzima do citocromo P450 (MANNNS *et al.*, 1991).

Cerca de 10 a 20% dos pacientes portadores de HAI mostram-se soronegativos para AAN, AAML, e AAMFR, inicialmente, apesar de um ou mais destes autoanticorpos surgirem mais tardiamente durante o curso da doença. Isso pode vir a representar um problema para o diagnóstico da doença, no entanto o diagnóstico de HAI ainda pode ser realizado com base nas alterações bioquímicas, na elevação de IgG sérica, nas características histológicas, e na exclusão de outras causas de doença hepática, assim como alguns pacientes podem apresentar anticorpos pANNA ou autoanticorpos contra tireoide mesmo com função tireoidiana normal. Além disso, existem vários outros autoanticorpos, denominados autoanticorpos hepáticos, para os quais testes ainda não estão amplamente disponíveis, mas que são de considerável importância para o diagnóstico da HAI, pois alguns ocorrem em pacientes com ou sem a presença dos autoanticorpos convencionais. Estes englobam os anticorpos que reagem com o receptor asialoglicoproteína hepático (ASGPR) (TREICHEL *et al.*, 1994; CZAJA *et al.*, 1996), com antígeno citosólico específico do fígado (LC1) (LAPIERRE *et al.*, 1999), com um antígeno solúvel hepático (SLA) e um antígeno fígado - pâncreas (LP). SLA foi recentemente clonado e foi comprovado ser idêntico com o LP, e o anticorpo correspondente é agora reconhecido como anti-SLA/LP (WIES *et al.*, 2000; COSTA *et al.*, 2000; CZAJA *et al.*, 2002).

2.2.7 Genética

A hepatite autoimune (HAI) pode ser definida como uma doença complexa, uma vez que múltiplos fatores tanto dentro quanto fora do hospedeiro podem afetar a sua ocorrência, expressão clínica e prognóstico. Algumas hipóteses atuais sugerem que um fator ambiental, viral, ou relacionados a algumas drogas desencadeia a doença em um hospedeiro geneticamente suscetível. Polimorfismo em qualquer um dos genes que regulam e controlam os processos de apresentação de antígenos, inflamação, imunossupressão e fibrose pode tornar um indivíduo suscetível a HAI ou determinar a gravidade da síndrome clínica.

O complexo principal de histocompatibilidade (MCH) representa um sistema hereditário de antígenos tissulares autossômicos codominantes, consistindo em um grupo distinto, porém intimamente relacionado, de loci genéticos localizado principalmente no braço curto do cromossoma 6. A região do gene do MCH encontra-se estruturalmente e funcionalmente dividida em três regiões; sendo que duas codificam antígenos de histocompatibilidade (HLA). Assim, o MCH da classe I engloba os alelos HLA A, -B e -C; o da classe II abrange a região HLA-D; e o da classe III inclui os genes que codificam os componentes do complemento C4A, C4B, C2 e fator B. As moléculas do MCH classe I e II estão envolvidas no mecanismo de apresentação do antígeno, no seu reconhecimento e na resposta imune (MANNING; KRÜGER, 1994). Os genes MCH classe I e II revelam um alto polimorfismo (DONALDSON *et al.*, 1994).

O linfócito T efetor reconhece um antígeno somente se o mesmo for apresentado na superfície do hepatócito por um antígeno de histocompatibilidade. Assim, a relação entre a molécula do HLA, o antígeno apresentado por ele e o receptor da célula T é primordial (MANNING; KRÜGER, 1994).

O antígeno entraria no hepatócito por endocitose, e a molécula do HLA classe II se fusionaria ao endossoma que o contém, sendo que após proteólise do antígeno, haveria formação de um complexo que seria transportado para a membrana da célula e apresentado ao linfócito CD4 (DONALDSON *et al.*, 1994).

A hipervariabilidade do HLA classe II pode favorecer o surgimento da HAI. Assim, certos alelos no locus HLA poderiam predispor à doença. A substituição de determinados aminoácidos no local de ligação, da molécula HLA-DR com o antígeno, pode determinar tanto a suscetibilidade à doença quanto a severidade da mesma. Somente a predisposição é herdada e não a doença, a qual deverá ser desencadeada por um antígeno (DONALDSON *et al.*, 1994).

2.2.8 Patogênese

A patogênese ainda não foi estabelecida, sendo a hipótese mais provável baseada na citotoxicidade mediada por células em um hospedeiro geneticamente suscetível (CZAJA, 1995). Assim, um hospedeiro geneticamente predisposto, quando exposto a um agente ambiental, desencadearia um processo autoimune direcionado a antígenos hepáticos,

promovendo um processo necroinflamatório progressivo, que resultaria em fibrose e cirrose (KRAWITT, 1996).

A apresentação de constituintes da membrana da célula hepática às células processadoras de antígenos é facilitada pela exposição aberrante de antígenos de histocompatibilidade (HLA de classe II) na superfície do hepatócito. Estas células ativadas, por sua vez, estimulam a expansão de linfócitos T citotóxicos, que produzem necrose celular ao infiltrarem o tecido hepático e liberarem citotoxinas. O fator que leva à exposição aberrante do HLA ainda não é conhecido, mas existem evidências que agentes virais, drogas, fatores ambientais e genéticos atuam neste sentido. (CZAJA, 1995).

2.2.9 Tratamento

A gravidade dos casos de HAI e a escassa possibilidade de remissão espontânea da doença levam ao tratamento imediato, excluindo as outras causas de hepatopatia crônica já no diagnóstico. A terapêutica destina-se a redução da atividade necroinflamatória e da fibrose hepática, e, conseqüentemente impedir ou retardar a progressão para a cirrose, a insuficiência hepática e a morte.

A fase de indução visa a remissão das manifestações clínicas do paciente, a redução das aminotransferases para níveis considerados normais ou, no máximo, duas vezes esse valor, e a redução do infiltrado inflamatório hepático (BANERJEE *et al.*, 2006). Após o término da indução inicia-se a fase de controle permanente, pois a HAI pode evoluir para a insuficiência hepática ou apresentar recaídas, a qualquer momento.

A resposta completa ao tratamento é obtida quando os sintomas desaparecerem por 6 meses ou mais, há normalização de todos os testes de função hepática ou pelo menos comprovação da atividade inflamatória mínima no quadro histológico hepático. Essa comprovação histológica é alcançada através da biópsia hepática, mais tardiamente, pois a normalização ocorre, geralmente, após 12 meses de tratamento. Uma resposta favorável à indução pode ser observada desde o primeiro mês de terapêutica. Nesse período, pode ocorrer uma melhora acentuada dos sintomas e uma redução dos valores em todos os testes de função hepática em torno de 50%. A caracterização de uma resposta favorável ocorre quando as manifestações clínicas desaparecem e os níveis séricos de ALT e AST atingem, no máximo, duas vezes o limite superior da normalidade. Na maioria dos casos, isso é alcançado nos

primeiros 6 meses de indução, mas, muitas vezes, essa condição clínica só é atingida entre 6 e 12 meses de indução, estabelecendo o término dessa fase do tratamento.

O tratamento de indução estabelecido em consenso pela Associação Americana para Estudo de Doenças Hepáticas preconiza a associação de prednisona e azatioprina. A prednisona (corticosteroide) inibe as interleucinas I e II, diminuindo a proliferação dos linfócitos T, o que leva a uma supressão da multiplicação dos linfócitos B e da produção de imunoglobulinas, e redução da inflamação hepática. Esse efeito é obtido pela menor produção de prostaglandina, pelo fator de necrose tumoral e pelo aumento da fagocitose local. A azatioprina consiste em um análogo das purinas que inibe a síntese de ácido nucleico e reduz as populações de células T *killer* e não *killer*. O seu efeito apresenta-se um pouco menos intenso e mais lento em relação ao da prednisona (FERREIRA *et al.*, 2003). A utilização dessa droga tem como objetivo promover um efeito terapêutico sinérgico ao da prednisona e possibilitar a redução da dosagem do corticosteroide e, conseqüentemente, diminuir os efeitos adversos dose-dependente.

Anteriormente, a indução era realizada com prednisona na dosagem de 1 a 2 mg/kg/dia (máx. 60 mg/dia), o que pode ser reduzido para 0,1 a 0,25 mg/kg/dia, quando associada à azatioprina (1,5 a 2,0 mg/kg/dia) (PORTA, 2000). A remissão é alcançada em mais de 2/3 dos pacientes com a associação das duas drogas, e se caracteriza pelo desaparecimento dos sinais e sintomas clínicos e redução das aminotransferases. Alguns estudos analisaram a resposta ao uso conjunto de prednisona e azatioprina na indução e manutenção de tratamento. Ferreira *et al.* (2002) empregaram doses diárias das drogas em 38 casos e atingiram resposta completa em trinta pacientes (79%), resposta parcial em quatro (10,5%) e falha do tratamento em quatro (10,5%). Um paciente faleceu antes do início do tratamento e dois abandonaram o tratamento após 14,7 e 75,5 meses. O tempo de acompanhamento dos 39 pacientes variou de 3,9 a 141,6 meses e ocorreram sete óbitos (17,9%). Eles constataram que o tratamento com corticosteroide e azatioprina em doses diárias mostrou-se efetivo.

Porta (2000) descreveu resultados positivos com poucos efeitos colaterais e sem perda de crescimento com uso de corticosteroide em dias alternados, e de azatioprina contínuo. Primeiramente, ele lançou mão da prednisona diariamente, na dose de 1 a 1,5 mg/kg, associada à azatioprina, na dose de 1 a 1,5 mg/kg durante 6 semanas. Após obtenção de uma resposta clínica e laboratorial satisfatória, ele conduzia a redução do corticosteroide com uso em dias alternados enquanto a azatioprina permanecia durante todo o tratamento em doses diárias. Gregório *et al.* (1997) empregaram a prednisolona isoladamente em doses diárias, e a associaram a azatioprina apenas para os pacientes que apresentaram intolerância ao

corticosteroide ou necessitaram doses elevadas na fase de manutenção da doença. Com isso, reconhece-se que a terapêutica de cada paciente deve ser otimizada, segundo suas respostas clínica e laboratorial, levando em conta o aspecto histológico hepático, que deve atingir mínima atividade inflamatória (MA *et al.*, 2006; ALVAREZ *et al.*, 1999; PORTA, 2000; BANERJEE *et al.*, 2006).

Entretanto, há uma parcela de aproximadamente 20 a 30% dos pacientes que não respondem ao tratamento com prednisona e azatioprina, constituída, principalmente, por crianças entre 2 e 14 anos com HAI tipo 2, e por pacientes com longa evolução sem tratamento da doença. Nesses casos, a ciclosporina, um inibidor calcineuronal responsável pelo bloqueio da transcrição das citocinas e da multiplicação das células T, com efeitos terapêuticos semelhantes aos dos corticosteroides e aos da azatioprina, tem sido empregada (ALVAREZ *et al.*, 1999; CUARTEROLO *et al.*, 2006). Alvarez *et al.* (1999), no estudo pioneiro com 32 crianças portadoras de HAI, serviu-se da droga na dose de 4 mg/kg/dia por 6 meses, com introdução da prednisona 0,5 mg/kg/dia (pequena dose) e azatioprina 1,5 mg/kg/dia, posteriormente. Oito semanas após o início do tratamento, iniciava-se a redução gradual da ciclosporina. Nesse grupo, 25 pacientes apresentaram nível sérico de ALT normal em 6 meses, e 30 pacientes alcançaram a normalização em 1 ano. Esse estudo apontou que a ciclosporina induz a remissão do processo necro-inflamatório da HAI em crianças, com poucos e bem tolerados efeitos adversos (ALVAREZ, 2004). Cuarterolo *et al.* também alcançaram remissão clínica satisfatória da HAI ao utilizar ciclosporina. A quase totalidade (92%) respondeu à indução com a normalização das transaminases nos primeiros 6 meses. Entretanto, Vergani *et al.* (2004) apresentaram índice de remissão menor da HAI com a ciclosporina (78%) em relação ao esquema terapêutico com prednisona e azatioprina (94%).

A fase de manutenção precisa ter início logo após a obtenção da remissão clínica, uma vez que houve a constatação da ocorrência de recaída da HAI praticamente em todos os casos nos quais o esquema de indução é interrompido, exceto em raros pacientes com HAI do tipo 1 (PORTA, 2000). O esquema de manutenção de drogas deve ser utilizado por, pelo menos, 2 anos. Para que se proponha a interrupção do tratamento, faz-se necessário o desaparecimento das alterações histológicas do fígado (FERREIRA *et al.*, 2003). A manutenção abrange o uso isolado da prednisona (1 mg/kg/dia) ou da azatioprina (1,5 a 2,0 mg/kg/dia) ou a associação das duas drogas com um declínio da dosagem de prednisona (0,1 a 0,25 mg/kg/dia). O esquema associado visa evitar os efeitos colaterais do uso prolongado de alta dosagem de corticosteroide. A monoterapia com azatioprina para a manutenção ainda não conta com

respaldo suficiente da literatura, podendo ocasionar hepatotoxicidade (BANERJEE *et al.*, 2006).

O controle do paciente na fase de manutenção acontece a cada 6 a 8 semanas durante os primeiros 6 meses, e, posteriormente, a cada 3 a 6 meses enquanto perdurar o tratamento. Durante esses retornos, uma avaliação clínica dos exames laboratoriais, englobando hemograma completo, contagem de plaquetas, tempo de protrombina, tempo de tromboplastina parcial ativada, tempo de trombina, amino-transferases (AST e ALT), gama GT, fosfatase alcalina, eletroforese de proteínas e bilirrubinas é realizada.

Durante a fase de manutenção, as recaídas ocorrem em cerca de 30 a 50% das crianças que tiveram resposta favorável ao tratamento. A recaída é reconhecida por meio dos seguintes eventos: aumento dos níveis de AST e ALT séricos, duas vezes acima do limite superior da normalidade; presença de atividade inflamatória na histologia hepática obtida através de biópsia; reaparecimento dos sinais e sintomas (PORTA, 2000; CUARTEROLO *et al.*, 2006). As recaídas da HAI são mais frequentes na fase de redução das doses para a retirada dos imunossupressores, especialmente da prednisona (KRAWITT, 2006). Maggiore *et al.* (1984) constataram elevado índice de recaídas (90%) quando interromperam o tratamento, da mesma forma que Ferreira *et al.* (2005) observaram 54,5%, nos primeiros 12 meses após a interrupção do tratamento. Todavia, recaídas tardias também são frequentes, durante a fase de suspensão do tratamento, mesmo nos pacientes que usaram os imunossupressores durante anos.

Na atualidade, considera-se que a interrupção prematura do tratamento pode conduzir a uma maior frequência de recaídas, com potencial para provocar danos irreversíveis ao fígado (MONTANO – LOZA *et al.*, 2007). A reinstituição do esquema terapêutico primitivo induz a uma nova remissão, porém novas recaídas podem ocorrer durante as tentativas de retirada dos imunossupressores. Nesses casos elege-se pela elevação da dosagem diária da azatioprina. Outra alternativa para os casos de recaídas frequentes é o emprego da ciclosporina, que vem demonstrando bons resultados (MAGGIORE *et al.*, 2004). Existem ainda outros medicamentos recentemente utilizados que vem se mostrando promissores no tratamento da HAI, incluindo o micofenolato de mofetil cuja ação na HAI sucede da interferência na produção de DNA e na proliferação de linfócitos ativados (CZAJA; CARPENTER, 2005). Estudos propõem benefícios em casos refratários ou intolerantes à terapia convencional, enquanto outros demonstram ineficácia no tratamento com essa medicação. Portanto, torna-se necessário a realização de mais estudos que validem a eficácia do micofenolato de mofetil. A budesonida, um glicocorticoide empregado como alternativa no

tratamento da HAI moderada mostrou resultados ainda controversos. A rapamicina foi empregada com sucesso em casos de HAI recorrente ou com surgimento pós-transplante hepático (HAI *de novo*) ao reduzir a ativação de células T e inibir a interleucina 2. Ainda encontra-se em fase de experimentação a 6-mercaptopurina, metabólito ativo da azatioprina, efetiva em alguns pacientes intolerantes à azatioprina (DING-YOU; SCHWARZ, 2004).

Os efeitos colaterais oriundos do tratamento da HAI compõem um motivo essencial de preocupação, uma vez que apresentam um considerável potencial de gravidade. No estudo de Ferreira *et al.* (2002), observou-se que dos pacientes em uso de prednisona e azatioprina, 27,8% sofreram complicações que motivaram a interrupção ou a regularização da dose, dentre elas, listam-se sepse; leucopenia; catarata subcapsular; diabetes mellito; encefalopatia; distúrbio gastrointestinal; e pancitopenia. O corticosteroide consiste no fator primordial responsável pelo surgimento desses efeitos nos quais a interferência no crescimento mostra-se uma condição adversa assídua, culminando em redução da velocidade do primeiro ao quinto ano de tratamento. A corticoterapia pode originar também obesidade, *facies* cushingóide, estrias, acne, hirsutismo, osteoporose, diabete melito, hipertensão arterial, catarata, glaucoma e psicose. O aparecimento de *facies* cushingóides e ganho de peso, observados na maioria dos pacientes, são aceitáveis, sem gerar a necessidade de interromper o tratamento. Por sua vez, os efeitos mais intensos ou severos conduzem à necessidade de redução da dosagem ou à interrupção da medicação (FERREIRA *et al.*, 2002; FERREIRA *et al.*, 2003). A toxicidade da azatioprina pode ser observada em aproximadamente 5% dos casos através de manifestações como hepatite colestática, exantema, pancitopenia, ocorrência de tumores e de má-formação fetal em longo prazo. A ciclosporina pode desencadear hipertricose, hiperplasia gengival, insuficiência renal e hipertensão. Independente da alta constância e da potencial severidade dos efeitos adversos dos medicamentos, o mérito da terapia legitima-se pelo desfavorável progresso natural da doença, em que cerca de 40% dos pacientes falecem em 6 meses após o diagnóstico (CZAJA; CARPENTER, 2005).

Os pacientes que não respondem ao tratamento, muitas vezes, carecem de transplante hepático (CZAJA; FREESE, 2002; ALVAREZ *et al.*, 1999; PORTA, 2000). Este deve ser considerado em todos os pacientes com HAI descompensada e com cirrose avançada em que se observa a encefalopatia, hipertensão portal, sangramento de varizes esofágicas, ascite, peritonite bacteriana e septicemia recorrente. Como ainda não estão reconhecidos os fatores que predizem o prognóstico em longo prazo, a determinação de condução do transplante deve ser tomada após se exaurir as tentativas com imunossupressores (CZAJA; FREESE, 2002; FERREIRA *et al.*, 2003).

A sobrevida de 5 anos dos pacientes com HAI pós-transplantados aumentada para 80%, número semelhante ao de pacientes não transplantados sob corticoterapia convencional (CZAJA; FREESE, 2002). A incidência total de rejeição do órgão coloca-se entre 56 e 83% nos pacientes transplantados por HAI, enquanto a rejeição córtico-resistente varia entre 22 e 59% (FERREIRA *et al.*, 2003). A recorrência da HAI após o transplante pode surgir em 20 a 33% dos casos, na maioria das vezes durante o segundo e o terceiro ano pós-transplante, durante a fase de redução do tratamento imunossupressor (FERREIRA *et al.*, 2003; CZAJA; CARPENTER, 2005). A recorrência acumulada pós-transplante é de 8% no primeiro ano e 68% em 5 anos; a metade dos casos consta de pequena intensidade, mas pode haver a necessidade de retransplante nos mais severos (FERREIRA *et al.*, 2003). Em crianças, a recorrência pós-transplante revela-se maior que entre os adultos, e apresenta maior dificuldade ao tratamento (CZAJA; FREESE, 2002; CZAJA *et al.*, 2004).

O progresso de cada caso resulta da resposta à conduta terapêutica que se mostra tanto melhor quanto mais rápido for o diagnóstico, para alcançar a normalização clínica e dos níveis séricos das aminotransferases. Devido à especificidade do tratamento, compete ao pediatra a desconfiança do diagnóstico e o encaminhamento ao hepatologista pediátrico, que irá conduzir o controle e a progressão da doença.

2.3 Saliva

A saliva apresenta-se como um líquido aquoso, produzido e secretado pelas glândulas salivares maiores e menores, que, juntamente ao fluido crevicular gengival, constitui a saliva total humana (STH), responsável pela manutenção da homeostase da cavidade bucal. As glândulas salivares maiores abrangem o par de glândulas parótidas, localizadas próximas aos primeiros molares dos maxilares, e as glândulas submandibular e sublingual, que se encontram no assoalho da cavidade bucal. As glândulas salivares menores localizam-se no lábio inferior, na língua, no palato, nas bochechas e na faringe. Segundo Edgar (1990), as glândulas salivares menores são mais importantes por causa da presença dos seus componentes protetores. Enquanto, as glândulas maiores produzem uma maior quantidade de saliva, no entanto, com a qualidade de seu conteúdo e o tipo de produção variáveis.

As glândulas distinguem-se pelo tipo de secreção produzida, determinada pela proporção de células glandulares serosas ou mucosas. As glândulas parótidas são inteiramente

glândulas serosas e secretam um fluido aquoso sem mucina, enquanto que as glândulas submandibulares e sublinguais são mistas (seromucosa), produzindo uma secreção rica em mucina, o que a torna mais viscosa (CARRANZA *et al.*, 2005; SCHIPPER *et al.*, 2007). Já as glândulas salivares menores são essencialmente mucosas (PUY, 2006).

A saliva é produzida em respostas a impulsos nervosos aferentes oriundos dos núcleos salivares localizados em torno da junção da medula e da ponte. Esses núcleos são estimulados pelo paladar e por estímulos táteis da língua e da mucosa oral, assim como outros estímulos corticais como cheiro, ansiedade e depressão. Os centros salivares, por sua vez, liberam impulsos nervosos através de nervos externos de ambas as divisões simpáticas e parassimpáticas do sistema nervoso autônomo para as glândulas salivares, promovendo a secreção de saliva (DIAZ-ARNOLD; MAREK, 2002).

A formação da saliva ocorre em dois estágios. Inicialmente, a secreção primária acontece no ácino e é modificada à medida que passa pelos ductos. Forma-se a secreção primária através do movimento ativo dos íons de sódio e cloreto no lúmen, o que gera um gradiente osmótico, levando ao movimento passivo da água. Em seguida, outros componentes acinares são adicionados antes que o fluido entre no ducto onde os íons sódio são ativamente reabsorvidos e os íons potássio e bicarbonato são secretados. Os componentes macromoleculares são formados no retículo endoplasmático das células acinares, processados nas vesículas secretoras do aparelho de Golgi e exportados da célula por exocitose (EDGAR, 1990; MANDEL, 1987).

De início, a saliva apresenta-se isotônica, mas se torna hipotônica à medida que passa pela rede de ductos. O pH normal da saliva encontra-se em torno de 6 a 7 o que a torna levemente ácida (HUMPREY; WILLIAMSON, 2001).

O fluxo médio diário de saliva total varia em pessoas saudáveis na faixa de 500 a 1500 ml e o volume médio de saliva presente na cavidade bucal é aproximadamente 1 ml, porém há uma grande variabilidade nas taxas individuais do fluxo salivar. A faixa do fluxo normal aceita para saliva não estimulada está situada acima de 0.25 ml/min. Para saliva estimulada, o volume mínimo para faixa normal cresce para 1ml/min (HUMPREY; WILLIAMSON, 2001).

O fluxo segue um ritmo circadiano, decrescendo durante o sono e aumentando durante as horas de vigília. Essas variações circadianas do fluxo salivar afetam o nível de concentração dos componentes salivares como os eletrólitos e as proteínas salivares (DAWES, 1987). Edgar & O'mullane, em 1996, descrevem que a quantidade e a qualidade da composição salivar sofrem variações relacionadas ao ritmo biológico circadiano. O fluxo salivar atinge seu pico no final da tarde e torna-se praticamente nulo durante o sono. Os

autores enfatizam que o ritmo circadiano é um valioso fator a ser considerado quando se pretende realizar estudos com a saliva, pois a secreção salivar mostra-se menor no período da noite em relação ao período diurno. Entretanto, a concentração de proteínas encontra-se maior à tarde. As concentrações de eletrólitos, tais como sódio e cloretos são nitidamente maiores pela manhã, enquanto que o potássio é excretado pela saliva no crepúsculo. Os teores de cálcio e fosfato salivares são maiores à noite (DOUGLAS, 1998).

O fluxo salivar é requerido para uma variedade de protocolos clínicos e experimentais com o objetivo de fornecer uma ideia a cerca da qualidade da saúde, não só oral, mas também sistêmica (LEITE *et al.*, 2002). É possível determinar o valor do fluxo salivar, medindo tanto o volume quanto o peso da saliva coletada.

Segundo Jenkins (1970), a composição salivar difere nas diversas glândulas. A glândula parótida contribui com aproximadamente 10% do volume salivar não estimulado, no entanto, produz parte significativa da saliva estimulada. Dessa forma, a saliva estimulada é quase que totalmente representativa do tipo de secreção produzido pelas parótidas. As medidas de variação do fluxo das diferentes glândulas mostram que a glândula submandibular produz o maior fluxo em condição de repouso, porém, quando o fluxo é estimulado, a parótida é mais responsiva que a submandibular. A contribuição percentual das diferentes glândulas salivares durante o fluxo não estimulado de saliva apresenta-se como se segue: 10% da parótida, 65% da submandibular, 7 a 8% da sublingual e menos de 20 % das numerosas glândulas salivares menores. A taxa de fluxo estimulado muda drasticamente o percentual de contribuição de cada glândula com a parótida contribuindo com mais de 50% do total de secreção salivar.

2.3.1 Composição salivar

Como já mencionado, além do fluido de origem glandular, a saliva total humana (STH) apresenta componentes de origem não glandular, incluindo o fluido gengival, detritos celulares, secreções das vias áreas superiores e microrganismos da cavidade bucal (NAGLER *et al.*, 2002; APS; MARTENS, 2005). Douglas (1998) descreve STH como uma combinação dos produtos aquosos da secreção das glândulas salivares maiores e menores, compostos orgânicos (proteínas e enzimas) e inorgânicos (íons e sais minerais), restos alimentares, microrganismos, produtos do metabolismo bacteriano, células que descamam do epitélio

bucal, muco da cavidade nasal, faringe e fluido transudato da mucosa e exsudato dos sulcos gengivais.

A água é o principal componente da saliva, representando 99% de sua constituição. Os componentes sólidos, caracterizados por moléculas orgânicas e inorgânicas, encontram-se dissolvidos no constituinte aquoso, e apresentam uma ampla variação de um indivíduo para outro e no mesmo indivíduo diversas vezes durante o dia, assim como também em resposta a diferentes estímulos (EDGAR, 1990). Esses componentes participam em funções relacionadas com áreas, em geral, incluindo a modulação do pH, capacidade tampão da saliva, limpeza, agregação e/ou ataque aos microorganismos orais, contribuição ao metabolismo da placa dental e modulação do processo de desmineralização e remineralização (HUMPREY; WILLIAMSON, 2001).

A composição salivar sofre variações em função da velocidade do fluxo salivar. Este está intimamente relacionado ao tipo, intensidade e duração do estímulo utilizado na obtenção da amostra. Há também alterações significativas na composição salivar em diferentes indivíduos e no mesmo indivíduo sob diferentes circunstâncias. No entanto, a velocidade do fluxo salivar é considerada o principal fator que afeta a composição salivar (EDGAR, 1990).

- Componentes Inorgânicos

A saliva é composta por uma variedade de íons inorgânicos. Dentre eles, encontram-se sódio, potássio, cloro, cálcio, magnésio, bicarbonato, fosfato, sulfatos, tiocianato e flúor, responsáveis pelo balanço osmótico, capacidade tampão e remineralização (DIAZ-ARNOLD; MAREK, 2002). Trabalhos como o de Dawes (1969) relacionam o fluxo salivar e a composição dos eletrólitos. Além disso, o pH e a composição iônica também influenciam na atividade dos componentes orgânicos da saliva (DODDS *et al.*, 2004). Para Humphrey e Williamson (2001), bicarbonato, fosfato e ureia atuam como moduladores do pH e são responsáveis pela capacidade tampão da saliva. Os íons cálcio e fósforo, em conjunção com as proteínas, participam do processo dinâmico de desmineralização e remineralização que ocorre entre os dentes e a saliva.

- Componentes Orgânicos

Também se encontram na saliva imunoglobulinas, proteínas, enzimas, mucinas e produtos nitrogenados como a ureia e a amônia. As proteínas salivares (amilase, lipase, proteases, nucleases, mucinas e gustina) auxiliam no processo digestivo; apresentam propriedades antibacterianas para hidrólise das membranas celulares (lactoferrina, lisozima e lactoperoxidase) e inibem a aderência dos microorganismos (imunoglobulinas) (DIAZ-ARNOLD; MAREK, 2002).

2.3.2 Função

As funções salivares destinam-se para manter a saúde bucal e para criar um balanço ecológico apropriado. Dentre elas, encontram-se lubrificação e proteção, ação tamponante e limpeza, manutenção da integridade dos dentes, atividade antibacteriana e digestão (MANDEL, 1987).

A saliva lubrifica e protege os tecidos orais, agindo como uma barreira contra irritantes. Esses irritantes incluem enzimas proteolíticas e hidrolíticas produzidas na placa, possíveis carcinógenos provenientes do fumo, produtos químicos exógenos e dessecação da respiração bucal, dentre outros. Qualquer contato intraoral entre os tecidos moles, entre os tecidos moles e os dentes ou entre os tecidos moles e próteses assim como a mastigação, a fala e a deglutição são beneficiados pela capacidade de lubrificação da saliva fornecida em grande parte pelas mucinas (EDGAR, 1990). As mucinas, excretadas pelas glândulas salivares menores, compreendem os melhores componentes lubrificantes da saliva. Consistem em moléculas complexas de proteínas presentes predominantemente com dois tipos de peso moleculares formados a partir de cadeias polipeptídicas que permanecem juntas. As mucinas apresentam propriedades tais como baixa solubilidade, alta viscosidade, alta elasticidade e forte adesividade (SLOMIANY *et al.*, 1996; TABAK, 1990).

Uma parte importante do papel multifuncional das mucinas salivares na preservação da integridade da mucosa é a sua capacidade de regular os níveis de cálcio intracelular (SLOMIANY *et al.*, 1996). Como integrantes da película de esmalte, as mucinas ajudam a iniciar a colonização bacteriana pela promoção do crescimento da flora oral comensal benigna, formando uma barreira protetora e lubrificação excessiva contra o desgaste,

proporcionando uma barreira de difusão contra a penetração de ácido, e limitando a saída de minerais da superfície do dente (TABAK, 1990). As mucinas também desempenham função antibacteriana por meio de modulação seletiva da adesão dos microorganismos as superfícies dos tecidos orais, contribuindo para o controle da colonização bacteriana e fúngica.

A ação tamponante e a limpeza da saliva concretizam-se por meio dos seguintes componentes: bicarbonato, fosfato, ureia, proteínas anfotéricas e enzimas. O bicarbonato é o sistema tampão mais importante. Difunde-se dentro da placa, atuando como tampão pela neutralização de ácidos. Além disso, produz amônia para a formação de aminas, que também servem como tampão, neutralizando ácidos (MANDEL, 1987). A ureia, outro tampão presente na saliva, libera amônia depois de ser metabolizada pela placa bacteriana e, portanto, aumenta o pH da placa. A ação tamponante da saliva funciona com mais eficiência durante altas taxas de fluxo estimulado, mas se apresenta quase ineficaz durante o período de baixo fluxo de saliva não estimulada (EDGAR, 1990).

A manutenção da integridade dos dentes pela saliva facilita o processo de desmineralização e remineralização. A desmineralização acontece quando os ácidos se difundem através da placa e da película para a fase líquida do esmalte entre os cristais. A dissolução cristalina ocorre em um pH da placa em torno de 5 a 5,5 que é considerada a faixa de pH crítico para o desenvolvimento da cárie. Os minerais dissolvidos posteriormente se difundem para fora da estrutura do dente e para saliva que o circunda. A capacidade tampão da saliva influencia o pH da placa em torno do esmalte, inibindo assim a progressão da cárie. A espessura e o número de bactérias presentes na placa determinam a eficácia dos tampões salivares (EDGAR, 1990).

A remineralização compreende o processo de substituição dos minerais perdidos através da matriz orgânica do esmalte para seus cristais. A supersaturação dos minerais na saliva é de fundamental importância para este processo. As altas concentrações salivares de cálcio e fosfato são responsáveis pela maturação e remineralização do esmalte. A estaterina, um peptídeo salivar, contribui para a estabilização do cálcio e da solução de sais de fosfato, servindo como uma proteção do dente ao desgaste, podendo dar início a formação da película protetora através da ligação a hidroxiapatita. As proteínas, tais como estaterinas, histatinas, cistatinas, e proteínas ricas em prolina, são demasiadamente grandes para penetrar os poros do esmalte. Por isso, elas permanecem na superfície, ligadas à hidroxiapatita, o que ajuda no controle do crescimento cristalino do esmalte, permitindo a penetração de minerais no esmalte para a remineralização e limitando a sua saída. Esse controle da precipitação e da saída de minerais favorece a estabilidade da hidroxiapatita na estrutura externa do dente. A presença

de flúor na saliva aumenta a precipitação dos cristais, formando um revestimento de fluorapatita mais resistentes à cárie do que a estrutura original do dente.

As glândulas salivares são glândulas exócrinas e, como tais, secretam fluidos contendo agentes imunológicos e não imunológicos para a proteção dos dentes e das superfícies das mucosas. Os componentes imunológicos da saliva incluem IgA secretora, IgG e IgM. Já os componentes salivares não imunológicos são proteínas selecionadas, mucinas, peptídeos e enzimas. As imunoglobulinas, enquanto ativas nas superfícies das mucosas, atuam para neutralizar vírus, servem como anticorpos contra antígenos bacterianos e trabalham para agregar bactérias, inibindo, assim, a sua fixação nos tecidos (DOWD,1999).

O conteúdo salivar antibacteriano imunológico e não imunológico é oriundo de duas fontes diferentes, plasma e células ductais. Apresenta-se com diferentes respostas à estimulação e níveis diferentes de conteúdo. O conteúdo salivar antibacteriano não imunológico, tais como proteínas, mucinas, peptídeos e enzimas (lactoferrina, lisozima e peroxidase) ajudam a proteger os dentes contra insultos químicos, físicos e microbianos. A lactoferrina liga-se ao ferro na saliva. Esse processo torna o ferro indisponível como fonte de alimento para microorganismos que precisam de ferro para permanecerem viáveis (MANDEL,1987).

As lisozimas rompem as paredes celulares bacterianas, levando à destruição e inibição do crescimento bacteriano. Além disso, as lisozimas promovem a remoção de bactérias através da agregação. A peroxidase, também conhecida como sialoperoxidase ou lactoperoxidase, catalisa o metabolismo bacteriano através de produtos com tiocianato, que é altamente tóxico para os sistemas bacterianos (EDGAR 1987; EDGAR 1990). Adicionalmente, protege a mucosa dos fortes efeitos oxidantes do peróxido de hidrogênio produzido por bactérias orais (DOWD,1999). As proteínas, tais como glicoproteínas, estaterinas, aglutininas, proteínas ricas em histidinas e proteínas ricas em prolinas, trabalham para agregar bactérias. Este processo de aglomeração reduz a capacidade das bactérias de aderir a superfícies dos tecidos duros ou moles intraorais e, assim, controla a colonização bacteriana, fúngica e viral (MANDEL, 1989).

Finalmente, a saliva aprimora o gosto e inicia o processo digestivo. A hipotonicidade da saliva aumenta a capacidade de degustação de alimentos salgados e de outras fontes de nutrientes. A saliva tem um papel limitado no início da digestão total por iniciar a quebra do amido através da amilase, um dos principais componentes da saliva excretada pela parótida, que inicialmente dissolve açúcar. A contribuição da saliva para a quebra do amido é limitada porque a maioria da digestão do amido resulta da atividade da amilase pancreática e não da

amilase salivar. As enzimas salivares também iniciam a digestão de gordura. Mais importante, a saliva serve para lubrificar o bolo alimentar, o que ajuda na deglutição (EDGAR, 1990).

2.3.3 Saliva como meio diagnóstico

A análise da saliva tem como finalidade identificar indivíduos com doença e seguir o progresso do indivíduo afetado, avaliando a efetividade do tratamento empregado. Dentre as vantagens do uso desse recurso, pode-se enfatizar a facilidade de coleta do material e o seu manuseio, que são pontos extremamente fundamentais na operacionalização técnica desse tipo de exame. Segundo Lawrence (2002), os testes com saliva são mais seguros que testes com sangue, que possuem mais chances de expor os profissionais da saúde e da ciência ao vírus HIV ou da hepatite. As técnicas de coleta não invasiva para a saliva podem reduzir drasticamente a ansiedade e o desconforto para o paciente, além de simplificar a coleta de amostras para o monitoramento da saúde geral.

Giannobile (2000) descreve a saliva como uma fonte valiosa de informações clinicamente relevantes, uma vez que seus múltiplos componentes não apenas protegem a integridade dos tecidos bucais, mas também funcionam como biomarcadores de doenças e condições sistêmicas do indivíduo. Mudanças qualitativas na composição desses biomarcadores têm sido utilizadas na identificação de pacientes com maior suscetibilidade a certas doenças, na identificação de locais com doença ativa, na predição de locais que tem maior atividade da doença no futuro e/ou servindo como ferramenta de monitoração da efetividade de terapias.

A saliva pode ser conveniente na análise do risco de cárie e também no diagnóstico de outras doenças, usando métodos sialométricos (fluxo salivar) e sialoquímicos, nos quais determinadas substâncias podem ser dosadas e assim contribuir para o diagnóstico de doenças a partir do exame de níveis de elementos inorgânicos e orgânicos, como dosagens hormonais, pesquisa de agentes biológicos virais, bacterianos e fúngicos, além de marcadores biológicos úteis no diagnóstico e prognóstico do câncer.

A saliva pode ser considerada como glândula específica, coletada diretamente de uma glândula (parótida, submandibular, sublingual, glândulas salivares menores) onde a coleta de secreção de uma glândula isoladamente pode ser útil na avaliação da função dessa glândula para diagnóstico de alterações glândula-específica ou saliva total, representando uma mistura

das secreções das glândulas salivares acrescidos de substâncias oriundas do fluido crevicular gengival, secreções brônquicas ou nasais, células epiteliais descamadas, restos de alimentos, microorganismos e os produtos de seus metabolismos (KAUFMAN; LAMSTER, 2002). A saliva total é avaliada com o intuito de elucidar alterações sistêmicas.

Deve-se levar em consideração que as propriedades biológicas da saliva estão relacionadas à mistura de fluidos orais e seus conteúdos, motivo pelo qual se tem incrementado o uso da saliva total nas pesquisas. Em 2006, Lewis reporta que para a análise dos componentes bioquímicos da saliva o ideal é utilizar saliva total não-estimulada.

A coleta da saliva pode ser feita de forma estimulada ou não estimulada. A estimulação da produção de saliva pode ser feita de forma mecânica (goma de mascar, parafina, látex) ou química (ácido cítrico). A estimulação afeta a quantidade da saliva produzida, portanto, alguns de seus constituintes também são alterados (MANDEL, 1990). A coleta não estimulada é feita sem estímulos exógenos e o fluxo salivar pode ser alterado por estímulos olfatórios, exposição à luminosidade, posição do corpo e ciclo circadiano (KAUFMAN; LAMSTER, 2002).

Dawes (1993) menciona que uma variedade de fatores pode influenciar o fluxo e as características fisiológicas da saliva, incluindo o ritmo circadiano e atividades físicas. Esses fatores devem ser considerados quando a saliva é usada como um fluido diagnóstico. Segundo Falcão (2005) faz-se necessário tomar algumas medidas cautelares no que diz respeito à realização da coleta, tais como: a amostra deve ser sempre colhida entre 8:00 h e 10:00 h da manhã, para reduzir a interferência do ciclo circadiano em cada participante; sempre que possível utilizar pacientes do mesmo sexo, para que não haja interferência por causa do sexo; os pacientes devem ser avisados para que não comam, bebam, mascuem chiclete, façam exercícios, fumem ou escovem os dentes por até 2 horas antes da coleta; além disso, durante a coleta, o ambiente deve estar bem ventilado e os indivíduos sentados de forma ereta e relaxados por 5 minutos.

Andrade *et al.* (2007) descreveram os métodos atuais para a coleta e a obtenção da amostra de saliva, reportando uma grande variedade de métodos para coleta deste fluido oral, desde os mais simples até a utilização de dispositivos mais sofisticados para coleta.

Para Shipper *et al.* (2007) o primordial é que a coleta da saliva utilizada como material de pesquisas aconteça de maneira padronizada, uma vez que a composição salivar diversifica-se consideravelmente tanto intra como interindivíduos. Métodos não padronizados contribuem parcialmente para a elevada diversificação das informações disponíveis sobre os parâmetros salivares, tais como, composição, viscosidade e propriedades lubrificadoras.

Segundo esses autores, inúmeros motivos dificultam a avaliação da saliva total como, por exemplo, torna-se quase sempre difícil estimar qual componente representa os verdadeiros constituintes da saliva e quais possuem origem celular ou bacteriana, uma vez que, como resultado do metabolismo bacteriano, os componentes da saliva podem variar com o tempo. Portanto, a existência de restos celulares e, como consequência, a observação de um líquido turvo, pode interferir em muitas das técnicas analíticas. Um dos métodos para resolver esses problemas é a centrifugação da amostra o que permite a remoção das bactérias e os restos celulares.

2.3.4 Uso da saliva para detecção de doenças

Algumas doenças sistêmicas comprometem o correto funcionamento das glândulas salivares e, conseqüentemente, a produção de saliva, influenciando tanto na quantidade de saliva produzida quanto na qualidade desse fluido, uma vez que pode afetar os constituintes químicos e as propriedades físicas do mesmo. Essas alterações podem servir de parâmetro para o diagnóstico de determinadas doenças, contribuindo assim para que a saliva possa ser considerada válida entre o arsenal de exames complementares.

Por muito tempo, a saliva foi usada como meio de monitorar o risco de cárie, sendo empregada como meio biológico útil da medida da capacidade tampão e avaliação microbiológica. Atualmente, a saliva é objeto de estudos mais detalhados para o diagnóstico de doenças sistêmicas que afetam a função das glândulas salivares e a composição da saliva.

2.3.4.1 Doenças com desenvolvimento de agentes biológicos infecciosos

A microbiota bucal desempenha um papel importante na saúde humana e está diretamente ligada a doenças como a cárie dentária e a doença periodontal, que são as alterações crônicas mais comuns em humanos. Observa-se uma estreita associação entre *Actinobacillus actinomycetemcomitans* e a periodontite agressiva. O *Streptococcus mutans*, por sua vez, é o agente etiológico primário da cárie dentária. Há uma evidente relação entre a doença periodontal e o desenvolvimento de diversas doenças sistêmicas, entre elas, doenças

cardiovasculares (KINANE; LOWE, 2000), artrite (MERCADO *et al.*, 2001), pneumonia (SCANNAPIECO *et al.*, 1998; TERPENNING *et al.*, 2001) e diabetes (MILLER *et al.*, 1992).

Tang *et al.* (2003) conduziram um estudo para determinar o padrão de expressão das proteínas salivares em indivíduos adultos com periodontite. Analisaram a composição de proteínas salivares através do método de eletroforese em gel de poliacrilamida duodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) em amostras de saliva total não estimuladas obtidas antes e após tratamento convencional. Os resultados demonstraram que bandas de proteínas com 18 kD, 15 kD e 13 kD podem estar estreitamente relacionadas à ocorrência e recorrência de periodontites (MOURA *et al.*, 2007).

A saliva total representa um meio confiável para se avaliar a composição da microbiota bucal, apesar das variações que o fluxo salivar sofre em decorrência de alterações do ritmo circadiano e fatores como o estresse e exercícios.

Apesar da presença de fatores antimicrobianos salivares (TENOVUO, 1998), uma quantidade significativa de bactérias sobrevive e cresce na saliva (RUDNEY, 2000;). A resposta imunológica à infecção pela produção de anticorpos constitui a base de muitos testes diagnósticos em virologia. As imunoglobulinas presentes na saliva são oriundas das glândulas salivares e do soro sanguíneo. Há a predominância de imunoglobulina A secretora (IgA secretora), derivada de plasmócitos nas glândulas salivares, que representa o principal mecanismo de resposta imune específica da saliva. Por outro lado, as imunoglobulinas M e G (IgM e IgG), derivadas do soro, através do fluido crevicular gengival, estão presentes em concentrações inferiores àquela da IgA salivar. Os anticorpos que agem contra vírus e componentes virais podem ser detectados na saliva e assim representam um importante meio para diagnóstico de infecções virais agudas e infecções congênitas (MORTIMER; PARRY, 1988).

Estudou-se a saliva como forma de detectar imunoglobulina M (IgM) contra rubéola, obtendo-se uma especificidade de 96%, quando comparado ao do teste no soro sanguíneo considerado padrão ideal, apontando a utilização da saliva como uma alternativa válida para a obtenção de espécimes clínicos na investigação de casos como os da rubéola (VYSE *et al.*, 1999; OLIVEIRA *et al.*, 2000).

Amostras de saliva e de encéfalo de cães raivosos foram inoculadas em camundongos e avaliadas por imunofluorescência com o intuito de se avaliar a importância da saliva para o diagnóstico precoce da raiva. Essas amostras apresentaram resultados positivos frente às duas

técnicas, demonstrando uma correlação satisfatória entre os métodos e os espécimes utilizados (MOURA *et al.*, 2007).

O uso da saliva como meio para diagnóstico da infecção por *Helicobacter pylori* vem se tornando uma possibilidade atrativa para estudos epidemiológicos da infecção em crianças quando se considera a natureza não invasiva do exame. É rotina se utilizar testes para identificação de *Helicobacter pylori* a partir de amostras de biópsias gástricas, utilizando a hidrólise da urease, métodos de coloração e cultura. Sabe-se que os métodos invasivos demandam altos custos e, portanto, os métodos não invasivos tais como os exames sorológicos do sangue e o teste da respiração da uréia estão se tornando mais populares. O método PCR provou ser altamente sensível e específico e é considerado como o método da escolha para detectar o DNA do *Helicobacter pylori* na boca (BALLAM *et al.*, 2000).

É crescente o número de testes salivares desenvolvidos com o intuito de obter o diagnóstico da infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV). Os trabalhos têm revelado que esses testes baseados em anticorpos salivares específicos equivalem, em confiabilidade, àqueles realizados no soro, sendo, portanto, convenientes na utilização clínica e em estudos epidemiológicos (MALAMUD, 1992).

2.3.4.2 Doenças neoplásicas malignas

Streckfus *et al.* (2000) demonstraram o papel da saliva no diagnóstico do câncer de mama onde testes salivares para marcadores da doença foram estudados conjuntamente com a mamografia. A partir da análise em saliva, o fragmento solúvel do oncogene c-erbB-2, um marcador prognóstico do câncer de mama, bem como o antígeno 15-3 para câncer (CA15-3), foram significativamente maiores na saliva e no soro de mulheres com diagnóstico de câncer quando comparado ao observado em um grupo controle de mulheres saudáveis e indivíduos com tumores benignos. Adicionalmente, o uso da saliva pode ser importante no monitoramento dos níveis de c-erbB-2 em pacientes em tratamento quimioterápico e/ou cirúrgico, de forma que serve como avaliação da efetividade terapêutica em questão, bem como pode ser útil na preservação (BIGLER *et al.*, 2002).

O vírus Epstein-Barr (EBV) está relacionado com a ocorrência de mononucleose infecciosa e leucoplasia pilosa oral, bem como, associado com vários tipos de neoplasias malignas linfóides e epiteliais. A saliva é considerada um veículo para transmissão indivíduo -

indivíduo desse vírus. Mbulaiteye *et al.* (2006) desenvolveram um estudo na África onde verificaram os níveis de DNA do EBV na saliva e no sangue periférico de 600 crianças e suas mães. Com isso, observaram equivalência de resultados, o que foi considerado um importante fator de controle da infecção por EBV, uma vez que o linfoma de *Burkitt* é uma entidade mórbida endêmica na África.

O carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço consiste em uma doença debilitante que, quando diagnosticada precocemente, pode revelar uma sobrevida favorável em 80% dos casos. O CD44 representa uma família de isoformas que, em certos tumores, possuem expressão aumentada nos tecidos e na circulação. Franzmann *et al.* (2005) analisaram o CD44 solúvel na saliva como um possível marcador molecular para câncer de cabeça e pescoço e constataram que o exame pode ser eficaz para detectar esse tipo de câncer em todos os estágios.

2.3.4.3 Doenças psiquiátricas

Atualmente, existem estudos voltados para o acompanhamento de indivíduos com distúrbios psíquicos e monitoramento da resposta terapêutica. Grigor'ev *et al.* (2002) observaram o espectro das proteínas salivares por eletroforese em gel de poliacrilamida em indivíduos com distúrbios afetivos psicogênicos. Os resultados apontaram que a depressão está associada à diminuição do conteúdo proteico em diferentes frações do espectro e a diminuição mais marcante ocorreu na fração proteica com peso molecular em torno de 55 kD.

A síndrome do ardor bucal (SAB) apresenta forte componente emocional envolvido na sua etiologia. A avaliação sialoquímica revela elevação importante nos níveis de fosfato, cloreto e potássio nos indivíduos com sintomas da SAB, e, ainda, diferenças no padrão de expressão de proteínas salivares de baixo peso molecular quando da avaliação eletroforética, comparados a indivíduos saudáveis. Os níveis de fosfato, cloreto e potássio encontram-se elevados em indivíduos com intensa atividade do sistema nervoso simpático, o que pode ocorrer em situações de estresses emocionais (MOURA *et al.*, 2007).

2.3.4.4 Doenças autoimunes

A síndrome de Sjögren consiste em uma doença autoimune, caracterizada por disfunções nas glândulas salivares e lacrimais, ceratoconjuntivite seca, xerostomia, além de anormalidades sorológicas. Um procedimento útil no diagnóstico é a biópsia de glândula salivar menor e o resultado histopatológico revela um infiltrado linfocitário no parênquima da glândula. A avaliação sialométrica, utilizando-se de métodos com ou sem estimulação da secreção salivar, é um importante meio auxiliar no diagnóstico dessa doença, onde se observa uma redução na quantidade de saliva produzida. Essa informação, apesar de não ser patognomônica, apresenta uma importância clínica, uma vez que é útil na avaliação da progressão da cárie, na criação de ambiente favorável para o desenvolvimento de infecções fúngicas, no surgimento de dor na mucosa bucal e disfagia. A avaliação sialoquímica nos indivíduos acometidos pela síndrome de Sjögren revela aumento nas concentrações de sódio e cloreto (TISHLER *et al.*, 1997), e níveis elevados de IgG, IgA, lactoferrina e albumina, e ainda, diminuição na concentração de fosfato (STUCHELL *et al.*, 1984).

2.3.4.5 Endocrinologia

A facilidade da coleta de saliva simplificou as medidas seriadas dos níveis hormonais diariamente. Antigamente, os testes salivares pareciam pouco confiáveis para medição dos níveis hormonais, no entanto, com os avanços tecnológicos e o desenvolvimento de testes mais sensíveis o problema foi sendo minimizado (LAWRENCE, 2002).

O cortisol salivar é um indicador válido da concentração de cortisol no soro e não depende de fluxo salivar. Atualmente, a saliva está sendo usada para detectar os seguintes esteroides: cortisol, dehidroepiandrosterona, estradiol, estriol, progesterona e testosterona. Estes ensaios podem ser úteis em avaliações de humor e do comportamento emocional cognitivo, para prever a atividade sexual na adolescência do sexo masculino, para estudar a saúde e o desenvolvimento infantil, em considerações a depressão pré-menstrual e para triagem da síndrome de *Cushing*. Além disso, os níveis salivares de hormônios esteroides também podem ser usados para avaliar a função do ovário, para monitorar recém-nascidos

pré-termo e para avaliar os riscos de parto prematuro (STRECKFUS; BIGLER, 2002; LAWRENCE, 2002).

2.3.4.6 Uso da saliva para monitoramento de drogas

O uso de saliva para monitoramento de drogas e para detecção de drogas ilícitas tem avançado notavelmente. Atualmente, a saliva pode ser utilizada para detectar e/ou monitorar cotinina, canabinoides, cocaína, fenciclidina, opioides, barbitúricos, diazepinas, anfetaminas e etanol (STRECKFUS; BIGLER, 2002).

2.4 Relevância do uso da saliva como meio diagnóstico

De acordo com Mandel (1990), a saliva é o reflexo do corpo no que se refere aos níveis das substâncias naturais nos fluidos corporais, a uma ampla variedade de moléculas introduzidas com finalidades terapêuticas, aos estados emocional, hormonal, imunológico e neurológico e ainda, as influências nutricionais e metabólicas.

Uma série de estudos fortalece o valor diagnóstico da saliva (LAWRENCE, 2002). A razão para esse interesse está na habilidade dessa nova ferramenta diagnóstica para distinguir uma variedade de componentes salivares que são biomarcadores úteis em detectar mudanças da saúde corporal por meio de diversas tecnologias. A facilidade de coleta da saliva, bem como o fato de oferecer menor risco de contaminação para o operador quando do seu manuseio, representam aspectos importantes para subsidiar a escolha da mesma como meio de diagnóstico. Chappin *et al.* (2007) enfatizam a utilização da análise salivar como meio de diagnóstico, justificando a escolha pelo fato do método de coleta ser simples e não invasivo. O fluido oral é considerado seguro para o paciente e para o operador, sendo fácil e barato o seu armazenamento. Essas características tornam possível a avaliação de biomarcadores em recém-nascidos, crianças, idosos, indivíduos não colaboradores, e em várias circunstâncias nas quais o sangue e a urina não estão disponíveis.

Outra razão que justifica o aumento no interesse dos propósitos diagnósticos da saliva é a ligação com parâmetros bioquímicos tradicionais que aparecem na circulação em várias formas, existindo assim uma interrelação entre o soro sanguíneo e as concentrações dos componentes salivares. Os estudos realizados comparando resultados dos testes salivares com outros métodos de credibilidade científica comprovada, como dosagens sanguíneas de substâncias, têm tornado o método confiável e, portanto com sua aplicabilidade validada. Contudo, existem relatos de algumas dificuldades na utilização da saliva como substituta do sangue, como, por exemplo, a detecção de algumas proteínas salivares, devido à sua baixa concentração nesse fluido, em relação ao encontrado no sangue. Além disso, a metodologia da coleta deve ser bem padronizada, pois vários fatores externos e ambientais podem interferir no fluxo e na composição salivar.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Analisar quantitativamente os títulos de imunoglobulinas presentes na saliva de crianças e adolescentes com HAI e estudar o perfil de proteínas salivares de crianças e adolescentes com HAI, a partir da análise de proteínas presentes em saliva total humana (STH).

3.2 Objetivos Específicos

1. Analisar os títulos de IgA na saliva de crianças e adolescentes com HAI, comparando-os com os títulos de IgA obtidos da saliva de crianças e adolescentes sem HAI.
2. Analisar os títulos de IgE na saliva de crianças e adolescentes com HAI, comparando-os com os títulos de IgE obtidos da saliva de crianças e adolescentes sem HAI.
3. Analisar os títulos de IgG na saliva de crianças e adolescentes com HAI, comparando-os com os títulos de IgG obtidos da saliva de crianças e adolescentes sem HAI.
4. Analisar os títulos de IgM na saliva de crianças e adolescentes com HAI, comparando-os com os títulos de IgM obtidos da saliva de crianças e adolescentes sem HAI.
5. Analisar pH, fluxo salivar e concentração total de proteínas salivares em crianças e adolescentes com HAI, comparando-os com os dados de crianças e adolescentes sem HAI.
6. Identificar se o perfil proteico salivar de crianças e adolescentes com HAI se diferencia do perfil proteico salivar observado entre crianças e adolescentes sem HAI.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Aspectos Éticos

Este projeto de pesquisa foi submetido à avaliação pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Walter Cantídio, tendo sido aprovado em 25/04/2011 sob o protocolo de nº 028.03.11. (Anexo A). Todos os pacientes que fizeram parte desta pesquisa assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (Apêndice A) antes de sua participação neste trabalho; e da coleta de material biológico para análise, tendo sido mantido o sigilo dos resultados das análises, evitando a associação entre os mesmos e o nome de cada voluntário da pesquisa.

4.2 Protocolo clínico

4.2.1 Desenho

O desenho consistiu de um estudo transversal observacional e analítico.

4.2.2 Examinadores

A coleta das amostras foi realizada por um único examinador (mestranda). A referida examinadora desconhecia os resultados das análises concernentes a esses indivíduos, pois as amostras foram submetidas à análise, contendo apenas um número de identificação. A pesquisadora contou com o auxílio de um aluno bolsista durante a análise bioquímica das amostras, e foi responsável pela análise das imunoglobulinas salivares e do perfil proteico salivar.

4.2.3 Amostra

Este estudo foi desenvolvido no Município de Fortaleza, na Universidade Federal do Ceará (UFC). Um total de 12 (doze) crianças e adolescentes voluntários com HAI atendidos no Ambulatório de Hepatologia Pediátrica do Hospital Universitário Walter Cantídio, de ambos os sexos, com idade de 8 a 18 anos, foram selecionados para participar do estudo. Doze crianças e adolescentes sem doenças sistêmicas atendidos na Clínica de Odontopediatria da Universidade Federal do Ceará, de ambos os sexos, na mesma faixa etária, compuseram o grupo-controle.

4.2.4 Critérios de inclusão de participantes

Os seguintes critérios foram adotados no processo de recrutamento dos voluntários:

- Crianças e adolescentes de ambos os sexos;
- Sadias (com ausência de doenças sistêmicas, hereditárias ou congênitas) - Grupo Controle;
- Com idade situada na faixa de 0 a 18 anos;
- Portadoras de Hepatite Autoimune – Grupo de Estudo;

4.2.5 Critérios de exclusão de participantes

Foram excluídos do estudo voluntários que se enquadraram nos seguintes critérios:

- Presença de doenças sistêmicas, genéticas ou congênitas, identificadas durante o momento da anamnese, excetuando Hepatite Autoimune;
- Crianças ou adolescentes fazendo uso crônico de medicamentos, além dos que são rotineiramente prescritos no tratamento da Hepatite Autoimune.

- Crianças cujos pais ou responsáveis legais se recusaram a assinar o termo de consentimento livre e esclarecido.

4.2.6 Entrada do voluntário no estudo

Para a entrada do voluntário no estudo foi imprescindível a presença de um dos pais ou responsável legal pela criança e adolescente para que fosse esclarecido em detalhes a natureza e os objetivos do estudo e fosse obtido o consentimento livre e esclarecido, por escrito (Apêndice A), para o responsável pela criança e adolescente que soubesse ler e escrever. Para aqueles que não sabiam ler foi feita leitura verbal do referido e solicitação de impressão digital com subsequente assinatura de uma testemunha. Houve liberdade para retirada da criança e do adolescente do estudo a qualquer momento. Não houve ressarcimento em espécie para os pais, responsáveis, crianças e adolescentes participantes desta pesquisa.

4.2.7 Anamnese

Depois da devida assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido por parte dos responsáveis, os voluntários foram submetidos a uma anamnese para obtenção de informações concernentes ao seu estado geral de saúde (Apêndice B).

4.2.8 Exame dentário

Durante o procedimento de exame dos dentes os seguintes parâmetros foram averiguados e anotados na ficha dentária (Apêndice C):

1. Situação dos tecidos moles intraorais;

2. Identificação de todos os dentes presentes na cavidade oral: decíduos e permanentes;
3. Identificação dos dentes decíduos presentes na cavidade, já com mobilidade fisiológica;
4. Grau de mobilidade:
 - Grau 1 (cerca de 1mm de mobilidade)
 - Grau 2 (cerca de 2mm de mobilidade)
 - Grau 3 (cerca de 3mm de mobilidade)
5. Número de dentes:
 - Cariados (cavitados e não cavitados)
 - Restaurados
 - Extraídos devido à cárie
6. Número de superfícies:
 - Cariadas (cavitadas e não cavitadas)
 - Ausentes (devido à cárie)
 - Restauradas
7. Identificação todas as superfícies:
 - Cariadas (cavitadas e não cavitadas)
 - Ausentes (devido à cárie)
 - Restauradas
8. Situação periodontal

4.2.9 Coleta de saliva

A coleta de saliva (Figura 3) foi realizada na Clínica de Odontopediatria do Curso de Odontologia da Universidade Federal do Ceará. Após conclusão do exame dentário, duas amostras de saliva foram coletadas para cada participante, entre 8:00 h e 10:00 h horas da manhã para reduzir possíveis contribuições circadianas, após um mínimo de duas horas de jejum. Foi requerido por parte dos pais que os procedimentos rotineiros de higienização da cavidade oral fossem realizados uma hora antes da coleta. As amostras constituíram-se de saliva não estimulada, ou seja, a criança e o adolescente permaneceram em repouso por um

período de 10 minutos. Em seguida, a saliva não estimulada foi coletada, utilizando-se uma pipeta plástica (Figura 4). A saliva coletada foi colocada em tubos plásticos estéreis *Eppendorfs*® para posterior análise (FONTELES *et al.*, 2009).

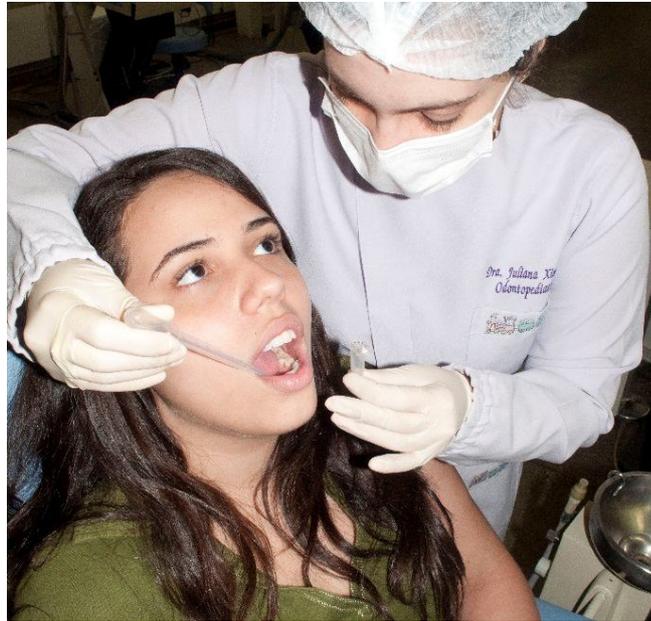


Figura 3: Coleta de saliva realizada na clínica de Odontopediatria da UFC.

Fonte: O autor



Figura 4: Acessórios utilizados durante a coleta de saliva

Nota: Tubo *Eppendorf*® e pipeta plástica

Fonte: O autor

4.3 Protocolo Analítico

4.3.1 Transporte e armazenagem da saliva

As amostras de saliva foram transportadas em tubos *Eppendorf*®, sob gelo. Para análise de títulos das imunoglobulinas salivares e do perfil proteico salivar, foram utilizadas amostras de saliva não estimulada conforme previamente descrito. Para cada 1 ml de saliva foram adicionados 5 µl do inibidor enzimático (Protease Inhibitor Cocktail P2714-1BTL, Sigma - Aldrich Brasil Ltda, São Paulo, Brasil) e, em seguida, as amostras foram centrifugadas a 3000g ou 5.700 rpm por 20 minutos a 4°C, sendo o sobrenadante separado, liofilizado e armazenado a - 80°C até análise (Figura 5).



Figura 5-A: Procedimentos realizados antes da liofilização - Amostras de saliva colocadas na centrífuga MPW-350R, MPW Med Instruments, Polônia.

Fonte: O autor



Figura 5-B: Procedimentos realizados antes da liofilização - Retirada do sobrenadante com auxílio de micropipeta.

Fonte: O autor

4.3.2 Mensuração do fluxo salivar

O fluxo salivar não estimulado foi medido com o paciente sentado na posição vertical com a cabeça inclinada de modo que a produção de saliva ficasse acumulada no assoalho da boca e, então, pudesse fluir para o ambiente externo através do lábio inferior em um recipiente milimetrado, durante 15 (quinze) minutos. O fluxo foi medido entre 8:00 h e 10:00 h, para reduzir possíveis contribuições circadianas, após um mínimo de duas horas de jejum. As taxas de fluxo salivar foram determinadas pela relação entre o volume coletado e pelo tempo. A velocidade de secreção salivar foi demonstrada em mililitros por minuto (ml/min). O valor foi determinado individualmente para todos os participantes de cada grupo.

4.3.3 Mensuração do pH

O pH salivar foi mensurado utilizando o pHmetro portátil digital (MARCONI, MARCONI, São Paulo) no local da coleta da saliva. Antes de iniciar as medições de pH, o pHmetro foi calibrado com soluções tampão padrões com pH nos valores de 7,0 e 4,0. Em seguida, o eletrodo foi posto em contato com a amostra de saliva que se desejava medir o pH. O valor do pH do *pool* da saliva foi determinado individualmente para todos os participantes de cada grupo.

4.3.4 Análise quantitativa das imunoglobulinas – ELISA

Os procedimentos preliminares concernentes à saliva realizados após a centrifugação e obtenção do sobrenadante foram realizados no laboratório de Bioquímica Humana da Universidade Estadual do Ceará. Em cada tubo *Eppendorf*® contendo saliva não estimulada liofilizada, foram acrescentados 500 L de água destilada para ressuspensão do material. A solução foi homogeneizada com auxílio de um agitador Vortex. Posteriormente, a amostra contida em cada tubo foi dividida em cinco partes. Cem microlitros de cada amostra permaneceram no tubo *Eppendorf*® para que fossem analisadas individualmente.

A saliva não estimulada ressuspensa foi submetida à análise de títulos das imunoglobulinas por meio de ensaio com imunoabsorvente ligado à enzima (ELISA- do inglês *enzyme-linked immunosorbent assay*), usando a saliva como anticorpo primário e um componente antianticorpo humano como anticorpo de captura. Microplacas de poliestireno foram revestidas com 1 microlitro de saliva (3µg de proteína) dissolvido em 99 µl de PBS(8g NaCl; 0,20 g KH₂PO₄; 2,89g Na₂HPO₄.12H₂O e 0,20g KCl dissolvidos em 1.000 ml de H₂O destilada) durante 16 hrs a 4 °C. Em seguida, a placa foi submetida a uma lavagem com solução salina fosfato - tamponada (PBS-0.05% Tween-20), para que 200 µl de PBS- Molico (5g de leite em pó desnatado Molico, Nestlé, Araçatuba, São Paulo/ 100 ml PBS) fossem adicionados em cada orifício da placa para a etapa de bloqueio durante 30 minutos. Após outra lavagem, 100 µl do conjugado peroxidase anti- IgA, conjugado peroxidase anti- IgE, conjugado peroxidase anti- IgG, conjugado peroxidase anti- IgM foram adicionados às

placas, e incubados por 2 hrs, a 37 °C. Após uma lavagem adicional, solução contendo substrato o-fenilenodiamina (a 0.4 mg/ml) e peróxido de hidrogênio a 0,01% da concentração final em 0,1M tampão de citrato de sódio fosfatado, pH 5,0, foram adicionados às placas. Depois de 15 minutos em temperatura ambiente, a absorbância foi lida em uma placa de leitura a 492 nanômetros (Figura 6).



Figura 6: Equipamento para leitura do ELISA (Plate Reader, DAS SRL, Roma, Itália)
Fonte: O autor.

4.3.5 Análise qualitativa das imunoglobulinas – *Western Blotting*

Géis de poliacrilamida (concentração 15%) foram usados para separação eletroforética da saliva. Um volume de 15 µl foi aplicado ao gel. A Eletroforese foi realizada por 1 hora a 150V. Depois da separação, as proteínas foram eletroforéticamente transferidas para membranas de nitrocelulose durante 2 horas, a 50mV. As membranas foram retiradas e incubadas com PBS- molico, por 30 minutos, para bloquear. Em seguida, foram realizadas quatro lavagens com Tris- 0,05% Tween-20 durante 15 minutos cada lavagem. As membranas foram então incubadas durante a noite, com amostras de conjugado peroxidase anti- IgG humano, diluídos de 1:100. Após lavagem com Tris- 0,05% Tween-20 (quatro vezes), finalmente, as membranas foram adicionadas à solução de substrato peroxidase

(diamino- benzidina 50mg/ml, 0,25% peróxido de hidrogênio em 0,05 m Tris, pH 7,4) para revelação.

4.3.6 Análise das proteínas salivares

4.3.6.1 Dosagem de Proteínas pelo Método de Bradford

A concentração de proteínas totais salivares (CPT) das alíquotas de saliva foi determinada pelo método de Bradford (1976), usando uma curva de albumina sérica bovina 56 (BSA) (0,5 a 5 mg/mL) como padrão. As amostras de saliva liofilizadas foram reconstituídas com 500 μ L de água destilada, sendo homogeneizadas com uso de um agitador mecânico. Foram adicionados 200 μ l de solução de Bradford a 4 μ l da amostra reconstituída. Em seguida, a solução foi homogeneizada e após 10 minutos, foram feitas as medidas da absorbância a 595 nm em Nanodrop 2000 (Figura 7). Os resultados foram expressos em (μ g de proteína / μ L), calculados com base na curva-padrão com BSA.



Figura 7: Equipamento para dosagem de proteína (NanoDrop 2000, Thermo Scientific, Estados Unidos)
Fonte: O autor.

4.3.6.2 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida em Presença de SDS e beta-mercaptoetanol

A avaliação do perfil proteico das amostras de saliva foi realizada utilizando-se eletroforese descontínua em gel de poliacrilamida, segundo a técnica descrita por Laemmli (1970), adaptada para géis (0,1 cm de espessura) de separação em placas (10 x 10 cm). O gel de aplicação foi preparado em solução-tampão Tris-HCl 1,5 M, pH 6,8 e SDS 1 %. O gel de separação continha 15% de poliacrilamida, preparado em tampão tris-HCl 1,5 M pH 8,8 em presença de SDS 1% .

As amostras de saliva, 6 g de proteína/poço, foram solubilizadas em tampão Tris-HCl pH 8,3, contendo SDS 1%, e azul de bromofenol 0,02 %, acrescidas de beta-mercaptoetanol na concentração de 1%, e incubadas a 100 °C por 5 minutos em banho-maria. Além das amostras de saliva, em todos os géis foi aplicada uma mistura de proteínas com massas moleculares conhecidas, a saber: fosfolisase B (97 kDa), albumina sérica bovina (66 kDa), ovalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), Inibidor de tripsina de soja (20,1 kDa) e Lisozima (14,4 kDa).

A corrida eletroforética foi realizada a uma voltagem constante de 120 V e amperagem iniciando em 40 mA (Figura 8). O tampão de corrida utilizado foi tris- HCl 0,025M/glicina 0,192 M, contendo SDS 0,1 % pH 8,8. Após a corrida, o gel de separação foi fixado em solução de TCA a 10 % por 1 h e em seguida foi corado *overnight* com solução de comassie R-250 0,05 %, preparada em solução de metanol/ácido acético/água na proporção de 1:3:5 (v/v/v) (Figura 9). O gel foi descorado em solução de metanol/ácido acético/água na proporção, de 1:3:5 (v/v/v).



Figura 8-A: Procedimentos realizados durante a eletroforese - Colocando as amostras de saliva no gel.

Fonte: O autor.

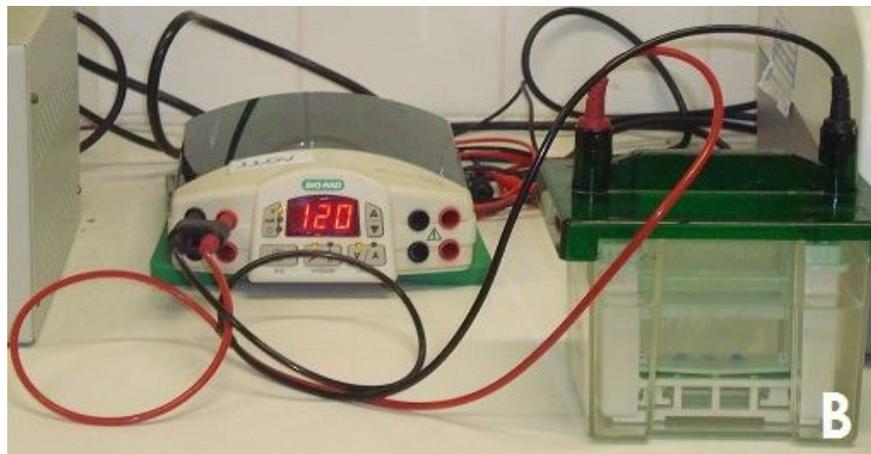


Figura 8-B: Procedimentos realizados durante a eletroforese – Aparelho para corrida do gel (Bio- RAD, Power Pac, Estados Unidos).

Fonte: O autor.



Figura 9: Coração do gel com solução de Comassie
Fonte: O autor.

4.4 Análise estatística dos dados

Os dados obtidos foram tabulados no programa *Excel* (*Windows 2007*) e submetidos à análise descritiva e aos seguintes testes estatísticos: teste de normalidade, teste *t* de *Student*, correlação de *Pearson* e teste exato de *Fisher*.

O teste de normalidade foi realizado para verificar a normalidade (homogeneidade) das amostras, acusando normalidade dos dados entre o grupo experimental e controle em função das variáveis: velocidade do fluxo de saliva total estimulada, pH, concentração de proteínas totais, análise unidimensional dos géis e análise das imunoglobulinas. Para as variáveis paramétricas (velocidade do fluxo de saliva total estimulada, pH, concentração de proteínas totais e análise das imunoglobulinas) o teste realizado foi o *t* de *Student*, considerando-se um nível de significância de 95% ($p \leq 0,05$). Para a comparação da massa molecular obtida na eletroforese realizou-se o teste exato de *Fischer*, tendo por base também um nível de probabilidade de $p \leq 0,05$.

5 RESULTADOS

Neste estudo foram coletadas e avaliadas as amostras de saliva total não estimulada de 12 pacientes portadores de hepatite autoimune e 12 pacientes sadios (grupo controle), pareados em sexo e idade para se obter uma amostra dependente, a fim de reduzir a variabilidade entre os grupos e aumentar o intervalo de confiança (Tabelas 3 e 4).

Tabela 3: Idade e distribuição dos pacientes por condição de saúde

IDADE (ANOS)	SAUDÁVEL	DOENTE
8	1	1
10	1	1
12	3	3
13	1	1
14	1	1
15	1	1
16	2	2
17	1	1
18	1	1
Total	12	12

Tabela 4: Distribuição dos pacientes por gênero e condição de saúde

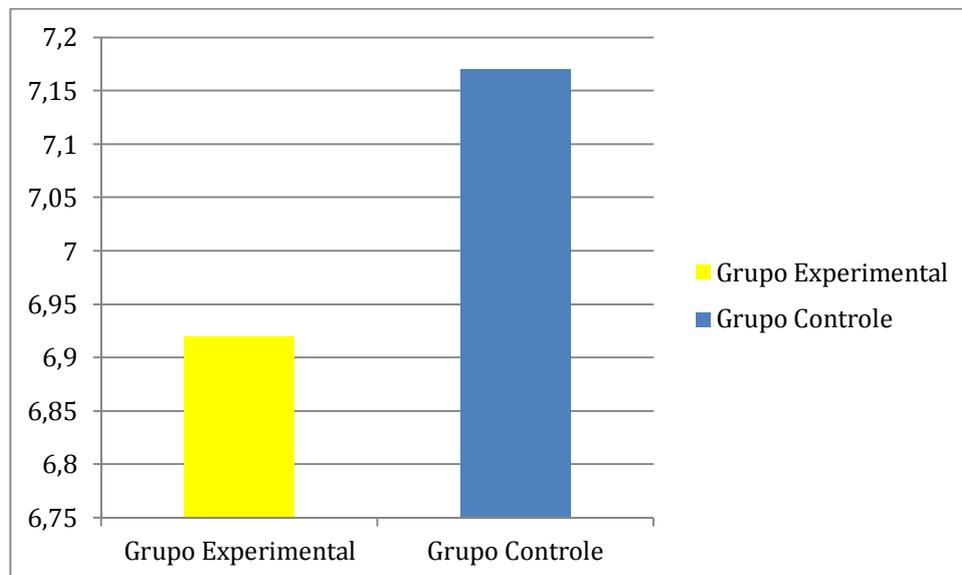
GÊNERO	SAUDÁVEL	DOENTE
Feminino	10	10
Masculino	2	2

Os valores médios e desvios-padrão dos parâmetros bioquímicos da saliva como pH, fluxo salivar não estimulado e concentração de proteína total, tanto no grupo controle (indivíduos saudáveis) como no grupo experimental (indivíduos portadores de hepatite autoimune) são mostrados na Tabela 5.

Tabela 5: Características biométricas

pH SALIVAR	N	MÉDIA	DESVIO PADRÃO	P-VALOR
Saudável	12	7,17	0,456	0,1835
Doente	12	6,92	0,436	
FLUXO SALIVAR				
Saudável	12	0,313	0,085	0,2266
Doente	12	0,261	0,116	
PROTEÍNAS TOTAIS				
Medida 1				
Saudável	12	2,667	0,601	0,4664
Doente	12	2,413	1,014	
Medida 2				
Saudável	12	2,605	0,587	0,5282
Doente	12	2,400	0,939	
Medida 3				
Saudável	12	2,760	0,626	0,2214
Doente	12	2,351	0,938	

Ao analisar o pH foi possível observar uma variação de 6.25 a 7.74 para o grupo experimental e para o grupo controle, não observando, portanto, valores de pH estatisticamente diferente entre os grupos ($p \leq 0,05$) (Gráfico 1). Em relação ao fluxo salivar não estimulado, o grupo experimental apresentou menor média que o grupo controle, porém essa diferença não foi estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$). A variação do fluxo salivar no grupo experimental foi de 0.13 a 0.33 mL/min (média = 0.261), enquanto que no grupo controle foi de 0.17 a 0.33 mL/min (média = 0.313) (Gráfico 2).

**Gráfico 1:** Valores médios do pH em saliva

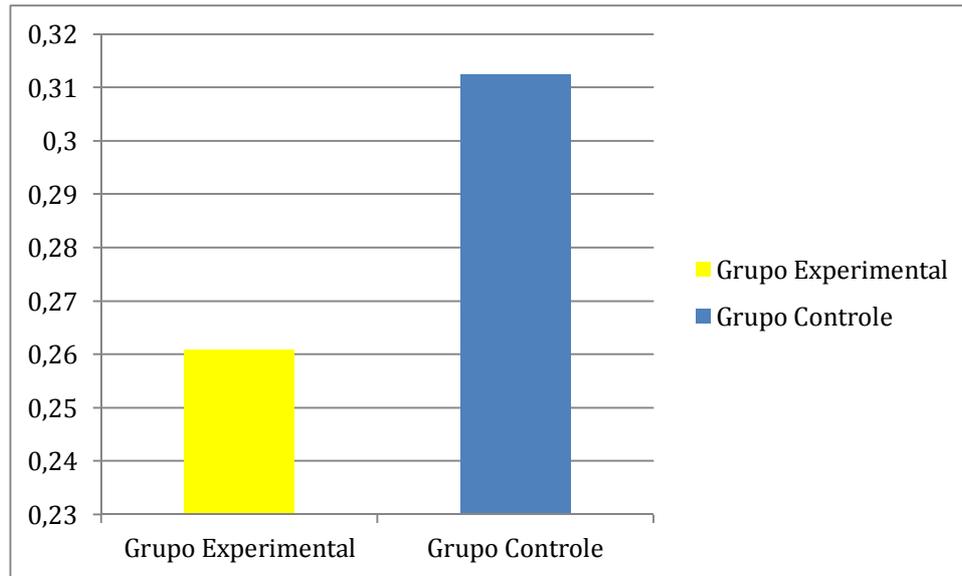


Gráfico 2: Média do fluxo salivar não estimulado

A concentração total de proteínas foi dosada em triplicata, considerando-se as amostras individuais. Não houve diferença estatisticamente significativa entre as amostras do grupo experimental e do grupo controle em relação às proteínas totais ($p \leq 0,05$) (Gráfico 3).

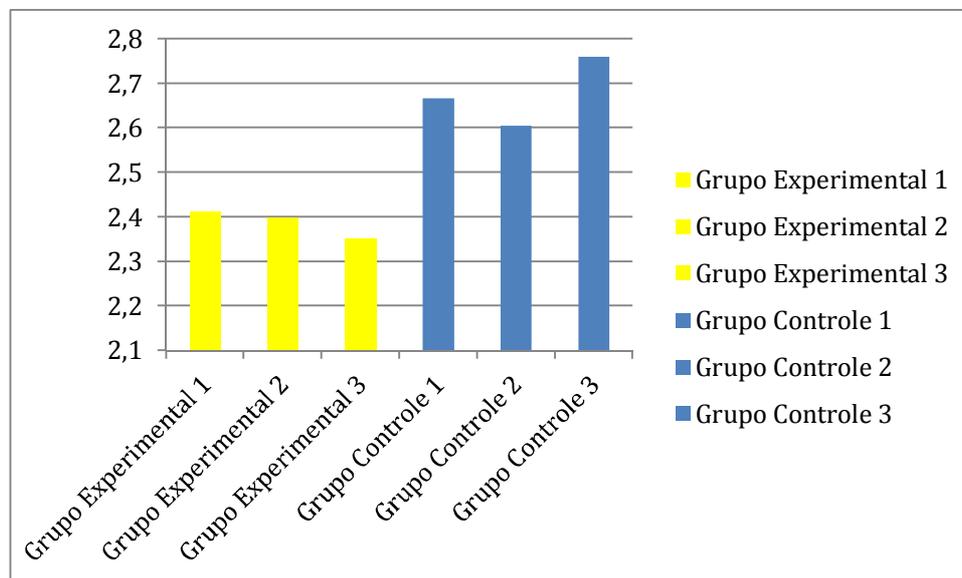


Gráfico 3: Média da concentração total de proteínas em ambos os grupos

Quando se realizou a eletroforese das proteínas salivares, 12 bandas proteicas puderam ser observadas (Figura 10). Os pesos moleculares dessas proteínas variaram entre 14,0 e 97,0 kDa. Duas bandas proteicas foram expressas em todos os indivíduos estudados: 66,0 e 97,0 kDa. As bandas identificadas expressaram, em sua grande maioria, ausência de relação entre

os grupos de crianças e adolescentes saudáveis e doentes. As bandas com pesos moleculares entre 20,1 e 14,4 kDa encontraram-se mais presentes entre os indivíduos doentes ($p=0,0013$), e as bandas com pesos moleculares em torno de 14,4 kDa encontraram-se mais presentes entre os indivíduos saudáveis ($p=0,0013$) como pode ser observado na Tabela 6.

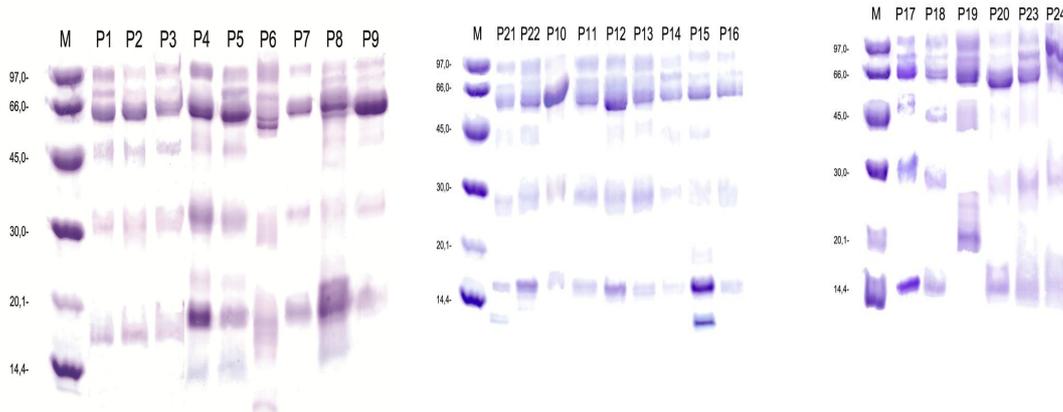


Figura 10: Gel de Poliacrilamida a 15% (SDS-PAGE) mostrando perfis de proteínas de saliva não estimulada do grupo de crianças com hepatite autoimune (P1-P22) e do grupo de pacientes sem hepatite autoimune (P10-P24). A 1ª coluna é o marcador de peso molecular.

Tabela 6: Distribuição dos pacientes em função da presença ou ausência da expressão de bandas proteicas com diferentes pesos moleculares.

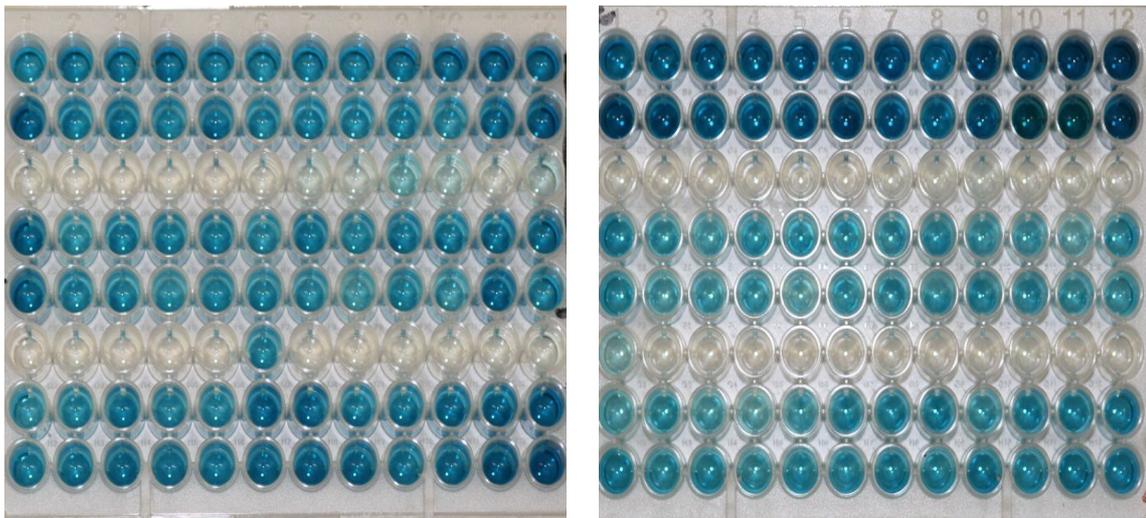
PESO MOLECULAR	AUSENTE		PRESENTE		P-VALOR
	SAUDÁVEIS	DOENTES	SAUDÁVEIS	DOENTES	
M[97] kDa	0	0	12	12	1
M]97-66[kDa	1	6	11	6	0,0686
M[66] kDa	0	0	12	12	1
M]66-45[kDa	12	11	0	1	1
M[45] kDa	3	3	9	9	1
M]45-30[kDa	12	11	0	1	1
M[30] kDa	1	0	11	12	1
M]30-20,1[kDa	11	10	1	2	1
M[20,1] kDa	10	10	2	2	1
M]20,1- 14,4[kDa	12	4	0	8	0,0013
M[14,4] kDa	1	8	11	4	0,0094
M< 14 kDa	11	10	1	2	1

A análise das amostras de saliva através do teste de *Western Blotting* permitiu a verificação da presença de imunoglobulinas IgG na saliva dos pacientes do grupo experimental e do grupo controle (Figura 11).



Figura11: Membranas de nitrocelulose após *Western Blotting*.

Todas as imunoglobulinas avaliadas (IgA, IgE, IgG e IgM) apresentaram níveis detectáveis no fluido salivar das crianças e adolescentes com e sem hepatite autoimune (Figura 12). A análise das amostras de saliva através do teste de ELISA permitiu a quantificação das imunoglobulinas presentes na saliva.



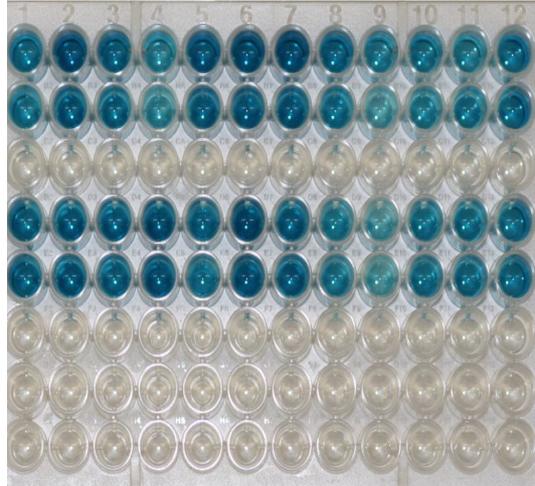


Figura 12: Placas de *ELISA* reveladas

As imunoglobulinas foram dosadas em duplicata. Com intuito de verificar a confiabilidade da saliva para dosagem das imunoglobulinas, realizou-se a correlação das medidas em duplicatas de cada imunoglobulina. Todas as medidas em duplicatas apresentaram correlação positiva. IgE e IgG expressaram uma correlação estatisticamente significativa. Enquanto nas demais imunoglobulinas, a correlação não foi estatisticamente significativa. IgE apresentou a correlação mais forte seguida por IgG, IgA e IgM.

Também foi realizada uma comparação entre as duplicatas de cada imunoglobulina e não houve diferenças estatística entre elas. (Tabela 7).

Tabela 7: Análise da correlação entre as medidas em duplicatas de cada imunoglobulina

MEDIDA	N	CORRELATION	P-VALUE	T	P-VALUE
IgA	24	0,331	0,1139	-1,196	0,2439
IgG	24	0,683	0,0002	-2,047	0,0523
IgM	24	0,186	0,3843	-1,912	0,0684
IgE	24	0,919	0,0000	1,403	0,1739

Na comparação das duplicatas de cada imunoglobulina entre o grupo de crianças e adolescentes com e sem hepatite autoimune, pode-se observar que os níveis de IgG obtidos foram maiores entre os pacientes doentes ($p=0,0012$), sendo isto confirmado nas duas medidas (duplicatas). Nas demais medidas não foram encontradas diferenças significativas, com confirmação nas duplicatas (Tabela 8).

Tabela 8: Distribuição, valores médios e desvio padrão das concentrações expressas em absorbância (nm) de cada imunoglobulina. Valores expressos em duplicatas após teste ELISA ($p \leq 0.05$)

ELISA	SAUDÁVEL			DOENTE			P-VALOR
	N	MEAN	STD. DEVIATION	N	MEAN	STD. DEVIATION	
IgA1	12	0,915	0,187	12	0,995	0,235	0,3622
IgA2	12	1,091	0,327	12	0,971	0,292	0,3514
IgG1	12	1,058	0,386	12	1,635	0,373	0,0012
IgG2	12	1,202	0,403	12	1,806	0,319	0,0005
IgM1	12	0,683	0,147	12	0,646	0,161	0,5610
IgM2	12	0,682	0,119	12	0,787	0,118	0,0409
IgE1	12	1,241	0,378	12	1,312	0,412	0,6641
IgE2	12	1,166	0,360	12	1,299	0,334	0,3577

6 DISCUSSÃO

A hepatite autoimune é uma doença necroinflamatória do fígado, de origem desconhecida, que ocorre em crianças e adultos, com uma predominância para o sexo feminino, o que pode ser observado em nosso estudo onde, dentre os 12 pacientes portadores de hepatite autoimune, 10 eram do sexo feminino. Ela é caracterizada pelos seus achados autoimunes, hiperglobulinemia (IgG), pela presença de autoanticorpos circulantes e pela sua boa resposta às drogas imunossupressoras, mas também está associada à elevada morbidade e mortalidade quando não tratada. Nesse contexto, a importância de um diagnóstico precoce e acurado se torna evidente. O diagnóstico definitivo para HAI requer a presença de alguns achados clínicos, laboratoriais e histológicos, incluindo a ausência de marcadores virais, níveis elevados de gamaglobulinas e a presença de autoanticorpos, dentre outros.

As descobertas da ciência podem influenciar a rotina da prática clínica em termos de diagnóstico, manejo clínico, monitoramento e previsão de resultados (INVERNIZZI *et al.*, 2007). Em virtude do interesse de se estabelecer uma associação entre saúde oral e saúde geral, os estudos vêm apontando cada vez mais na direção de se realizar análises salivares no diagnóstico de doenças sistêmicas e no monitoramento da saúde geral. A utilização da saliva, em substituição ao sangue ou urina, para exames diagnósticos proporciona uma série de benefícios representados por uma coleta fácil, indolor, não invasiva, que provoca menos ansiedade ao paciente, pelo baixo custo no armazenamento e transporte, bem como pelo fato de disponibilizar um menor risco de contaminação para o operador no momento do manuseio da mesma (DOUGLAS *et al.*, 1998).

Ao se avaliar a saliva como meio de diagnóstico, considera-se fundamental distinguir sua utilização para o diagnóstico da doença como, por exemplo, verificação da susceptibilidade à doença, identificação dos componentes normais à saliva em concentrações anormais e detecção dos constituintes incomuns (DAWES, 1993). No ramo da odontologia, o monitoramento da saliva tem sido utilizada principalmente para avaliar atividade de cáries, doença periodontal, xerostomia, doenças inflamatórias e tumorais das glândulas salivares (KAUFMAN; LAMSTER, 2000). Moura *et al.* (2007) relatam que dentre as diferentes possibilidades de uso da saliva como meio de diagnóstico, encontram-se a sua utilização nas medidas de risco de cárie, usando parâmetros como mensuração do fluxo salivar, capacidade tampão, potencial hidrogeniônico (pH) e contagem de microorganismos. Todavia, os progressos nos métodos de análise têm tomado outras proporções, de maneira a propiciar uma

extensão na aplicabilidade de outros métodos de análises salivares ampliando as possibilidades de diagnósticos.

O presente estudo se propôs a analisar alguns parâmetros salivares orgânicos de indivíduos portadores de hepatite autoimune (grupo experimental), comparando-os com indivíduos não portadores. Sabe-se que a composição da saliva passa por muitas alterações devido a vários fatores fisiológicos e não fisiológicos tais como ritmo circadiano, natureza e duração do estímulo, condições da higiene bucal, tipo de dieta alimentar, uso de medicamentos, etc. (DAWES, 1993). Por isso, há necessidade de seguir medidas preventivas no que diz respeito à realização da coleta. Neste estudo as amostras foram sempre colhidas entre 8 e 10 horas da manhã para minimizar a interferência do ritmo circadiano em cada participante; os indivíduos de ambos os grupos, do mesmo gênero e idade, foram alertados para não comer, beber, mascar chiclete, fazer exercícios, fumar ou escovar os dentes até 2 horas antes da coleta, estando os mesmos sentados de forma ereta e relaxada durante a coleta.

O presente trabalho não encontrou diferença estatisticamente significativa entre o fluxo salivar de pacientes portadores de hepatite autoimune (0,261 mL/ min) em relação ao grupo controle (0,313 mL/ min). Segundo os critérios estabelecidos por Dawes (2004), tanto o grupo experimental quanto o grupo controle apresentaram fluxo salivar considerado normal. Observou-se no presente trabalho que o tempo de coleta de saliva foi maior para crianças e adolescentes portadores de hepatite autoimune, por estas apresentarem uma tendência ao fluxo salivar diminuído apesar da diferença não ser estatisticamente significativa.

Outras condições sistêmicas como, por exemplo, as doenças autoimunes, as desordens hormonais, as neurológicas, as doenças psicogênicas, podem afetar o fluxo salivar. No geral, a causa mais comum de diminuição da produção salivar é a ingestão de drogas medicinais. Mais de 400 medicamentos têm efeitos colaterais que incluem xerostomia ou hipofunção das glândulas salivares (DIAZ-ARNOLD; MAREK, 2002). Pacientes que consomem uma grande quantidade de medicação diariamente têm sido associados a um aumento nas queixas de xerostomia. Navazesh *et al.* (1996) revelaram que as pessoas medicadas com, pelo menos, uma doença sistêmica e aquelas que tinham tomado medicação por mais de 2 anos apresentavam taxas de fluxo salivar significativamente mais baixas. Apesar do uso diário e prolongado de drogas imunossupressoras pelos indivíduos portadores de hepatite autoimune, nenhum paciente examinado relatou sensação de boca seca diariamente, nem mesmo disfonia, ingestão constante de líquidos ou sede excessiva.

As opiniões dos pesquisadores são ligeiramente divergentes quanto ao pH de repouso da saliva. Para Edgar (1996), o pH de repouso da saliva em humanos deve manter-se entre 5,0

e 8,0. A amostra dos dois grupos aqui estudados consistiram em crianças e adolescentes (08 a 18 anos), tendo sido encontrado um pH médio do grupo controle de 7,17 e 6,92 no grupo experimental. Não foram encontrados na literatura, estudos com um padrão de normalidade para o pH em pacientes com hepatite autoimune, o que dificulta a comparação dos dados com os de outros trabalhos, assim, embora não tenha sido observada uma diferença estatística entre as amostras, acredita-se que isto não seja clinicamente relevante, uma vez que a média do pH de repouso de ambos os grupos se encontrava dentro dos parâmetros de normalidade citados na literatura.

Há poucos estudos sobre a composição salivar em crianças (SEVENHUYSEN *et al.*, 1984; BEN-ARYEH *et al.*, 1984, 1990; TENOVUO *et al.*, 1986, 1987; HYYPPÄ *et al.*, 1989; KARGÜL *et al.*, 1994; DEZAN *et al.*, 2002; FARIAS; BEZERRA, 2003; RUHL *et al.*, 2005), principalmente quando realizado em crianças e adolescentes portadores de hepatite autoimune. Sabe-se que o polimorfismo genético na saliva, os fatores variáveis como a nutrição, bem como em determinadas alterações sistêmicas auto-ímmunes, como na Síndrome de Sjögren, ocorrem modificações no conteúdo salivar (AZEN, 1993; AGUIRRE *et al.*, 1993; PEDERSEN *et al.*, 2006). Nesta pesquisa, procurou-se estudar a relação da concentração de proteína total na saliva de crianças e adolescentes portadores de hepatite autoimune e pacientes saudáveis. É importante salientar que alguns fatores fisiológicos são capazes de influenciar a composição da amostra de saliva total, entre eles, encontram-se a fonte de saliva, o método de coleta e o grau de estimulação. Optou-se por estudar a saliva não estimulada das crianças e adolescentes, uma vez que os componentes salivares podem se alterar em função do tipo e duração do estímulo (KARGÜL *et al.*, 1994).

Em relação à concentração total de proteínas, o grupo com hepatite autoimune apresentou menor concentração (2,338 mg/mL) em relação ao grupo controle (2,677 mg/mL), não sendo essa diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$). Não houve diferença entre os sexos quanto à dosagem total de proteína, achado semelhante ao encontrado por Ben-Aryeh *et al.* (1984, 1990); Tenovuo *et al.* (1986) e Dezan *et al.* (2002).

Da mesma forma dos outros parâmetros avaliados, a comparação com os dados da literatura é dificultada pela ausência de estudos que reportem parâmetros salivares em pacientes com doenças hepáticas, principalmente os pacientes portadores de hepatite autoimune.

É uma tarefa árdua comparar o perfil das proteínas salivares em virtude das divergências existentes na procedência da saliva estudada (oriunda exclusivamente das glândulas parótidas e submandibulares, *versus* saliva total humana ou mista), faixa etária dos

grupos estudados, métodos de análises etc. As diferenças encontradas nos estudos sucedem principalmente da falta de padronização da coleta das amostras e dos métodos laboratoriais empregados. Técnicas de eletroforese são usadas para avaliar componentes proteicos salivares, no entanto um só método não é capaz de fornecer informação satisfatória de todas as proteínas salivares (KARGÜL *et al.*, 1994). Neste estudo, proteínas salivares foram analisadas pelo método de eletroforese descrito por Laemmli (1970), e procurou-se observar se houve diferença no perfil proteico entre crianças saudáveis e crianças portadoras de hepatite autoimune.

Apesar das bandas proteicas identificadas possuírem, em sua grande maioria, ausência de relação entre os grupos de crianças e adolescentes saudáveis e doentes, foi possível observar diferentes padrões de bandas proteicas nos dois grupos avaliados. Duas bandas proteicas foram expressas em todos os indivíduos estudados: 66,0 e 97,0 KDa. Comparando os grupos entre si foi possível observar que 75% das bandas proteicas evidenciadas no grupo experimental também foram evidenciadas no grupo controle. No entanto, a banda proteica mais frequentemente observada no grupo controle apresentou massa molecular em torno de 14,4 kDa, enquanto que no grupo experimental as massas moleculares mais prevalentes corresponderam a faixa 20,1 - 14,4 kDa.

A base para o diagnóstico baseado em saliva é o desenvolvimento de um catálogo completo das proteínas secretadas e que são detectáveis na saliva. Além da complexidade das proteínas, o maior desafio bioanalítico que as análises abrangentes de amostras de saliva enfrentam está relacionado à grande variação da abundância de proteínas, incluindo a presença de proteínas de alta abundância, como amilases, mucinas, proteínas ricas em prolinas e o complexo IgA secretor. Fang *et al.* (2007) identificaram 1.479 proteínas salivares humanas distintas, dentre elas encontram-se inúmeras proteínas que apresentam as massas moleculares semelhantes aquelas mais frequentemente observadas no nosso grupo experimental e controle como pode ser visualizado nos Anexos B e C. Havendo, portanto, a necessidade de estudos mais aprofundados para identificar essas proteínas. Tal identificação do perfil proteico da saliva dos pacientes portadores de hepatite autoimune irá melhorar tanto o conhecimento sobre a fisiologia oral, como também permitirá a identificação de novas proteínas e a identificação de mudanças nos níveis proteicos frente a diferentes condições fisiológicas ou estados patológicos.

A saliva, normalmente, contém anticorpos contra vários antígenos exógenos e existem alguns relatos de detecção de autoanticorpos relacionados a doenças na saliva (IKUNO *et al.*, 2001). Níveis elevados de imunoglobulina G são importantes marcadores diagnóstico para

HAI. O seu diagnóstico é baseado nos critérios que foram estabelecidos e modificados pelo grupo internacional de estudos da HAI, os quais incluem, além da elevação dos níveis séricos de IgG, os seguintes parâmetros: elevação dos níveis séricos das aminotransferases, ausência de marcadores virais, exclusão de doenças genéticas do fígado, ausência de comprometimento tóxico ou alcoólico, a presença de autoanticorpos e achados histológicos (FALLATAH; AKBAR, 2010).

De acordo com Gregório (2002), a detecção e a interpretação dos níveis séricos de IgG, na pediatria, desempenham um papel importante no monitoramento da resposta ao tratamento dos pacientes com HAI. A flutuação desses títulos está correlacionada com a atividade da doença. Além disso, segundo Moreira *et al.* (2010), o infiltrado inflamatório crônico, muitas vezes rico em células do plasma, é uma característica comum em todas as doenças autoimunes do fígado. Há evidências que sugerem que a identificação das subclasses de imunoglobulinas (Ig) predominantes dentro das células do plasma em biópsias hepáticas pode ser útil no diagnóstico diferencial de doenças hepáticas autoimunes. Recentemente, Daniels *et al.* (2009) estudaram especificamente o fenótipo imunológico de células plasmáticas no diagnóstico diferencial de cirrose biliar primária (CBP) e hepatite autoimune (HAI). Trinta e oito pacientes com HAI e 18 pacientes com CBP foram incluídos, todos os casos de HAI mostraram um predomínio de IgG no infiltrado de células plasmáticas, enquanto IgM prevaleceu sobre IgG em 88% dos casos CBP o que foi confirmado posteriormente em 2010 por Moreira *et al.*

O presente estudo foi o primeiro a descrever o perfil imunológico de pacientes portadores de hepatite autoimune em tratamento através dos níveis de imunoglobulinas na saliva desses pacientes. Ao comparar as crianças e adolescentes com e sem hepatite autoimune, pode-se observar que os níveis salivares de IgG encontravam-se maiores entre os pacientes doentes ($p=0,0012$). Quanto às demais imunoglobulinas salivares, não foram encontradas diferenças significativas entre os dois grupos. Os resultados corroboram parcialmente com Martin *et al.* (2009), que estudaram os níveis séricos de imunoglobulinas em uma criança de 14 anos de idade, portadora de hepatite autoimune, antes e após o tratamento imunossupressor. Eles encontraram que os níveis séricos de IgE e IgG decresceram após o tratamento para os níveis de normalidade, e os níveis séricos de IgA e IgM se mantiveram dentro da normalidade e não foram afetados pelo tratamento.

A população estudada caracterizou-se por ser de baixa renda, apresentando severas limitações no grau de instrução dos pais das crianças que participaram do estudo. Procurou-se controlar os fatores fisiológicos inerentemente capazes de influenciar qualitativa e

quantitativamente os componentes salivares avaliados, por meio da padronização no horário e método utilizado nas coletas de amostras. Dificuldades foram encontradas, associadas à pequena casuística em questão, devido à raridade da doença na faixa etária pediátrica e ao tratamento estabelecido onde somente um estudo multicêntrico com um esquema de tratamento padronizado poderá proporcionar um maior número de pacientes, levando a um conhecimento adequado acerca do perfil imunológico salivar desses pacientes.

Neste estudo, todavia, realizou-se trabalho pioneiro de caráter biomolecular do perfil de imunoglobulinas e proteico salivar em crianças com hepatite autoimune. Os resultados aqui apresentados permitem inferir que a saliva é um fluido capaz de demonstrar alterações sistêmicas, conforme evidenciado, entre pacientes com hepatite autoimune e indivíduos saudáveis, o que demonstra a necessidade da realização de mais pesquisas que utilizem a saliva como meio diagnóstico, além de estudos mais aprofundados, que permitam a identificação das proteínas e sua correlação com a hepatite autoimune.

7 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos pode-se concluir que:

- 1) Os grupos não apresentaram diferenças estatisticamente significativas quanto aos parâmetros de pH, fluxo salivar e concentração de proteínas totais;
- 2) O grupo de pacientes com hepatite autoimune apresentou níveis de IgG salivar mais elevados que as crianças e adolescentes saudáveis;
- 3) A expressão do perfil proteico salivar assemelha-se, em sua grande maioria, mas difere nos seguintes parâmetros: as bandas com pesos moleculares entre 20,1 - 14,4 kDa estão mais presentes entre os indivíduos doentes e as bandas com pesos moleculares em torno de 14,4 kDa estão mais presentes entre os indivíduos saudáveis.

REFERÊNCIAS

- AGUIRRE, A.; TESTA-WEINTRAUB, L. A.; BANDERAS, J. A.; HARASZTHY, G. G.; REDDY, M. S.; LEVINE, M. J. Sialochemistry: a diagnostic tool? **Crit. Rev. Oral Biol. Med.**, Alexandria, v. 4, n. 3/4, p. 343-350, 1993.
- ALVAREZ, F. *et al.* Short-term cyclosporine induces a remission of autoimmune hepatitis in children. **J. Hepatol.**, v.30, p. 222 – 227, 1999.
- ALVAREZ, F. *et al.* International Autoimmune Hepatitis Group report: review of criteria for diagnosis of autoimmune hepatitis. **J. Hepatol.**, v. 31, p.929–938, 1999.
- ALVAREZ, F. Treatment of autoimmune hepatitis: current and future therapies. **Curr. Opin. Gastroenterol.**, v.7, p. 413-420, 2004.
- ANDRADE, P.P.; IGLESIAS, D.P.P.; SOUZA, E.L; FREITAS, R.A.; GALVÃO, H.C.; Saliva: Métodos Atuais para Coleta e Obtenção da Amostra **Fac. Odontol. Porto Alegre**, v. 48, n. 1/3, p. 95-98, 2007.
- APS, J.K.M.; MARTENS, L.C. Review: the physiology of saliva and transfer of drugs into saliva. **Forensic Sci. Int.**, v. 150, p. 119–131, 2005.
- ARNOLD, A.M.D.; MAREK, C.A. The impact of saliva on patient care: A literature review. **J. Prosthet. Dent.**,v.88, p. 337-343, 2002.
- AZEN, E. A. Genetics of salivary protein polymorphisms. **Crit. Rev. Oral Biol. Med.**, Alexandria, v. 4, n. 3/4, p. 479-485, 1993.
- BALLAM, L. D.; MENDALL, M. A.; ASANTE, M.; MORRIS, J.; STRACHAN, D. P.; WHINCUP, P. H. *et al.* Western blotting is useful in the salivary diagnosis of *Helicobacter pylori*. **J. Clin. Pathol.**, London, v. 53, n. 4, p. 314-317, Apr. 2000.
- BANERJEE, S.; RAHHAL, R.; BISHOP, W.P. Azathioprine monotherapy for maintenance of remission in pediatrics patients with autoimmune hepatitis. **J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.**,v. 43, p. 353-356, 2006.
- BATTS, K.P.; LUDWIG, J. Chronic hepatitis. An update on terminology and reporting. **Am. J. Surg. Pathol.**, v. 19, p. 1409– 1417, 1995.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BELLOMO, M.A. *et al.* Clinical and Biochemical Features of Autoimmune Hepatitis in 36 Pediatric Patients. **Arq. Gastroenterol.**, v. 43, n.1, p. 45-49, 2006.

BEN-ARYEH, H.; LAPID, S.; SZARGEL, R.; BENDERLY, A.; GUTMAN, D. Composition of whole unstimulated saliva of human infants. **Arch. Oral Biol.**, v. 29, p. 357-362, 1984.

BEN-ARYEH, H.; FISHER, M.; SZARGEL, R.; LAUFER, D. Composition of whole unstimulated saliva of healthy children: Changes with age. **Arch. Oral Biol.**, v. 35, n. 11, p. 929-931, 1990.

BEN-ARI, Z.; CZAJA, A.J. Autoimmune hepatitis and its variant syndromes. **Gut**, v.49, p.589-594, 2001 .

BERSANI, A.L.S.; CONGIU, D.S.A.; NISHIMOTO, T.M.I. O tratamento da hepatite auto-imune em crianças e adolescentes: revisão. **Pediatria**, v. 29, n.4, p. 297-304, 2008.

BJARNASON, I.; MAGNUSSON, B.; BJORNSSON, S. Idiopathic chronic active hepatitis in Iceland. **Acta Med. Scand.**, v.211, p. 305– 307, 1982.

BIGLER, L. R; STRECKFUS, C. S.; COPELAND, M.; BURNS, R.; DAI, X.; KUHN, M. et al. The potential use of saliva to detect recurrence of disease in women with breast carcinoma. **J. Oral Pathol. Med.**, Copenhagen, v. 31, n. 7, p. 421-431, Aug. 2002.

BITTENCOURT, P.L. et al. Genetic heterogeneity in susceptibility to autoimmune hepatitis types 1 and 2. **Am. J. Gastroenterol.**, v.94, p.1906–1913, 1999.

BOBERG, K.M. et al. Incidence and prevalence of primary biliary cirrhosis, primary sclerosing cholangitis, and autoimmune hepatitis in a Norwegian population. **Scand. J. Gastroenterol.**, v. 33,p. 99–103, 1998.

BOGDANOS, D.P. et al. Autoimmune liver serology: Current diagnostic and clinical challenges. **World J. Gastroenterol.**, v. 14, n. 21, 2008.

CANCADO, E.L.R.; PORTA, G. Autoimmune hepatitis in South America. **Falk Symposium.**, v. 114, p. 82–92, 2000.

CARRANZA, M.; FERRARIS, M.E.; GALIZZI, M.; Structural and morphometrical study in glandular parenchyma from alcoholic sialosis. **J. Oral Pathol. Med.**, v.34, n.6, p.374–379, 2005.

CELLI, A. **Estudo retrospectivo clínico, laboratorial e anatomopatológico na hepatite auto-imune: comparação entre pacientes adultos e pediátricos.** Tese (doutorado) - Curso de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

CHAPPIN, S; ; ANTONELLI, G.; DE PALO, E.F.; Saliva specimen: a new laboratory tool for diagnostic and basic investigation; **Clin. Chim. Acta.**, v.383, n. 1/2, p. 30-40, 2007.

COSTA, M.; RODRIGUEZ-SANCHEZ, J.L.; CZAJA, A.J.; GELPI, C. Isolation and characterization of cDNA encoding the antigenic protein of the human tRNP((Ser)Sec) complex recognized by autoantibodies from patients with type-1 autoimmune hepatitis. **Clin. Exp. Immunol.**,v.121, p.364–374, 2000.

CUARTEROLO, M. et al. Follow-up of children with autoimmune hepatitis treated with cyclosporine. **J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.**, v.43, p.635-639, 2006.

CZAJA, A.J. Natural history, clinical features, and treatment of autoimmune hepatitis. **Semin. Liver Dis.**, v. 4, p. 1-12, 1984.

CZAJA, A.J. et al. Significance of HLA DR4 in type 1 autoimmune hepatitis. **Gastroenterology**, v.105, p.1502–1507, 1993.

CZAJA, A.J.; MANNS, M.P. The validity and importance of subtypes in autoimmune hepatitis: a point of view. **Am. J. Gastroenterol.**, v. 90, p.1206–1211, 1995.

CZAJA, A.J. Autoimmune hepatitis. Evolving concepts and treatment strategies. **Dig. Dis. Sci.**, v.40, p. 435-456, 1995 .

CZAJA, A.J.; CARPENTER, H.A. Validation of a scoring system for the diagnosis of autoimmune hepatitis. **Dig. Dis. Sci.**, v. 41, p. 305–314, 1996.

CZAJA, A.J.; CASSANI, F.; CATALETA, M.; VALENTINI, P.; BIANCHI, F.B. Frequency and significance of antibodies to actin in type 1 autoimmune hepatitis. **Hepatology**, v.24, p.1068–1073, 1996.

CZAJA, A.J.; PFEIFER, K.D.; DECKER, R.H.; VALLARI, A.S. Frequency and significance of antibodies to asialoglycoprotein receptor in type 1 autoimmune hepatitis. **Dig. Dis. Sci.**, v.41, p.1733–1740, 1996.

CZAJA, A.J.; CASSANI, F.; CATALETA, M.; VALENTINI, P.; BIANCHI, F.B. Antinuclear antibodies and patterns of nuclear immunofluorescence in type 1 autoimmune hepatitis. **Dig. Dis. Sci.**, v. 42, p.1688–1696, 1997.

CZAJA, A.J. et al. Associations between alleles of the major histocompatibility complex and type 1 autoimmune hepatitis. **Hepatology**, v.25, p. 317-323, 1997.

CZAJA, A.J. Frequency and nature of the variant syndromes of autoimmune liver disease. **Hepatology**, v.28, p. 360– 365, 1998.

CZAJA, A.J. Behaviour and significance of autoantibodies in type 1 autoimmune hepatitis. **J. Hepatol.**, v. 30, p.394–401, 1999.

CZAJA, A.J.; DONALDSON, P.T. Genetic susceptibilities for immune expression and liver cell injury in autoimmune hepatitis. **Immunol. Rev.**, v.174, p. 250–259, 2000.

CZAJA, A.J. et al. Autoimmune hepatitis: the investigational and clinical challenges. **Hepatology**, v.31, p. 1194– 2000, 2000.

CZAJA, A.J.; DONALDSON, P.T.; LOHSE, A.W. Antibodies to soluble liver antigen/liver pancreas and HLA risk factors for type 1 autoimmune hepatitis. **Am. J. Gastroenterol.**, v.97, p.413–419, 2002.

CZAJA, A.J.; FREESE, D.K. Diagnosis and treatment of autoimmune hepatitis. **Hepatology**, v.36, p.479-497, 2002.

CZAJA, A.J. et al. Treatment challenges and investigational opportunities in autoimmune hepatitis. **Hepatology**, v.41, p.207-215, 2004.

CZAJA, A.J.; CARPENTER, H.A. Empiric therapy of autoimmune hepatitis with mycophenolate mofetil. **J. Clin. Gastroenterol.**, v.39, p.819-825, 2005.

DANIELS, J.A.; TORBENSON, M.; ANDERS, R.A.; BOITNOTT, J.K. Immunostaining of plasma cells in primary biliary cirrhosis. **Am. J. Clin. Pathol.**, v. 131, p. 243-249, 2009.

DAVIES, A.J. Immunological tolerance and the autoimmune response. **Autoimmun. Rev.**, v. 27, p. 538-543, 2008.

DAWES, C. The effects of flow rate and duration of stimulation on the concentrations of protein and the main electrolytes in human parotid saliva, **Arch. Oral Biol.** v.5 p. 277–294, 1969.

DAWES, C. Physiological factors affecting salivary flow rate, oral sugar clearance, and the sensation of dry mouth in man. **J. Dent. Res.**, v.66, p. 648-653, 1987.

DAWES, C. Considerations in the development of diagnostic tests on saliva. **Ann. N Y Acad. Sci.** v. 20, n. 694, p. 265-269, 1993.

DAWES, C. How much saliva is enough for avoidance of xerostomia? **Caries Res.**, v. 38, n. 3, p.236-240, 2004.

DEZAN, C. C.; NICOLAU, J.; SOUZA, D. N.; WALTER, L. R. F. Flow rate, amylase activity, and protein and sialic acid concentrations of saliva from children aged 18, 30 and 42 months attending a baby clinic. **Arch. Oral Biol.**, v. 47, p. 423-427, 2002.

DING-YOU, L.; SCHWARZ, K.B. Autoimmune hepatitis. **Adolesc. Med. Clin.**, v.15, p.147-158, 2004.

DODDS, M. W.; JOHNSON, D. A.; YEH, C. K. *Health benefits of saliva: a review.* **J. Dent.**, v.33, n.3, p. 223-233, 2005

DOHERTY, D.G. et al. Polymorphism in the human complement C4 genes and susceptibility to autoimmune hepatitis. **Autoimmunity**, v.18, p.243–249, 1994.

DONALDSON, P.T. et al. Susceptibility to autoimmune chronic active hepatitis: human leukocyte antigens DR4 and A1-B8-DR3 are independent risk factors. **Hepatology**, v.13, p.701–706, 1991.

DONALDSON, P.; DOHERTY, D.; UNDERHILL, J.; WILLIAMS, R. The molecular genetics of autoimmune disease. **Hepatology**, v. 20, p. 225-239, 1994.

DOUGLAS, C. R. **Patofisiologia oral: fisiologia normal e patológica aplicada a odontologia e fonoaudiologia.** São Paulo: Pancast, 1998.

- DOWD, F.J. Saliva and dental caries. **Dent. Clin. North Am.**, v.43,p.579-597, 1999.
- EDGAR, W.M. Saliva: its secretion, composition and functions. **Br. Dent. J.**, v.172, p.305-312, 1987.
- EDGAR, W.M. Saliva and dental health. Clinical implications of saliva: report of a consensus meeting. **Br. Dent. J.**, v.169, p.96-98, 1990.
- EDGAR, W.M.; O'MULLANE, D.M. **Saliva and oral health**. 2nd ed. London: British Dental Association, 1996.
- EXTREMERA, R.A.; SALMERÓN, J. How Does Autoimmune Hepatitis Behave in Children? **Rev. Esp. Enferm. Dig.**, v. 99, n. 5, p. 249-254, 2007.
- FALCÃO, D.P. **Avaliação da Viscosidade Salivar e sua Relação com a Halitose**. 2005.133f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Faculdade de Odontologia, Universidade de Brasília, Brasília, 2005.
- FALLATAH, H.I.; AKBAR, H.O. Elevated serum immunoglobulin G levels in patients with chronic liver disease in comparison to patients with autoimmune hepatitis. **Libyan J. Med.**, v.5, p. 1-4, 2010.
- FANG, X. et al. Comparison of electrokinetics-based multidimensional separations coupled with electrospray ionization-tandem mass spectrometry for characterization of human salivary proteins. **Anal Chem.**, v. 79, n. 15, p. 5785-5792, Aug. 2007.
- FARIAS, D. G.; BEZERRA, A .C. B. Salivary antibodies, amylase and protein from children with early childhood. **Caries Clin. Oral Invest.**, v. 7, p. 154-157, 2003.
- FERREIRA, A. et al. Hepatite Auto-Imune em Crianças e Adolescentes: Estudo Clínico, Diagnóstico e Resposta Terapêutica. **J. Pediatr.**, v.78,n. 4, p.309-314, 2002.
- FERREIRA, A.R.; ROQUETE M.L.V.; PENNA, F.J.; TOPPA, N.H. Hepatite auto-imune em crianças e adolescentes: estudo clínico, diagnóstico e resposta terapêutica. **J. Pediatr.**, v.78, p.309-314, 2002 .
- FERREIRA, A.R.; ROQUETE, M.L.V.; PENNA, F.J. Tratamento da hepatite auto-imune em crianças e adolescentes. **Rev. Med. Minas Gerais.**, v.13, n.4, supl. 2, p.60- 67, 2003.
- FERREIRA, A.R.; ROQUETE, M.L.V.; PENNA, F.J.; TOPPA, N.H.; CASTRO, L.P.F. Hepatite auto-imune tipo 1 em crianças e adolescentes: avaliação da suspensão do tratamento imunossupressor. **J. Pediatr.**, v.81, p. 343-348, 2005.
- FONTELES C.S.R.; GUERRA M.H.; RIBEIRO T.R.; MENDONÇA D.N.; CARVALHO C.B.M.; MONTEIRO A.J.; TOYAMA D.O.; TOYAMA M.H.; FONTELES M.C. Association of free amino acids with caries experience and mutans streptococci levels in whole saliva of children with early childhood caries. **Arch. Oral Biol.**, v.54, p. 80-85, 2009.

FORDE, M.D.; KOKA, S.; ECKERT, S.E.; CARR, A.B.; WONG, D.T. Systemic assessments utilizing saliva: part 1 general considerations and current assessments. **Int. J. Prosthodont.**, v. 19, n.1, 43-52, 2006.

FRANZMANN, E. J.; REATEGUI, E. P.; CARRAWAY, K. L.; HAMILTON, K. L.; WEED, D. T., GOODWIN, W. J. Salivary soluble CD44: a potential molecular marker for head and neck cancer. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.**, Baltimore, v. 14, n. 3, p. 735-739, Mar. 2005.

GARCÍA, R.R. et al. Autoimmune Hepatitis in Pediatric Patients. **Rev. Esp. Enferm. Dig.**, v.99, p. 255-258, 2007.

GIANNOBILE, W.V.; BEIKLER, T.; KINNEY, J.S.; RAMSEIER, C.A.; MORELLI, T.; WONG, D.T.; Saliva as a diagnostic tool for periodontal disease: current state and future directions. **Periodontology**, v. 50, p. 52-64, 2000.

GREGORIO, G.V. et al. Autoimmune hepatitis in childhood: a 20-year experience. **Hepatology**, v.25, p.541– 547, 1997.

GREGORIO, G.V.; MCFARLANE, B.; BRACKEN, P.; VERGANI, D.; MIELI-VERGANI, G. Organ and non-organ specific autoantibody titres and IgG levels as markers of disease activity: a longitudinal study in childhood autoimmune liver disease. **Autoimmunity**, v.35, p. 515-519, 2002.

GRIGOR'EV, I. V.; ULANOVA, E. A.; LADIK, B. B. Characteristics of salivary protein spectrum in patients with depressive disorders (in search for biological markers of depression). **Klin. Lab. Diagn.**, Moskva, v. 1, n. 1, p. 15-18, Jan. 2002.

HENEGHAN, M.A.; MCFARLANE, I.G. Current and novel immunotherapy for autoimmune hepatitis. **Hepatology**, v.35, p.7–13, 2002.

HYYPÄ, T.; KARHUVAARA, L.; TENOVUO, J.; LUMIKARI, M.; VILJA, P. Antimicrobial factors in whole saliva of human infants: a longitudinal study. **Pediatr. Dent.**, v. 11, n. 1, p.30-36, 1989.

HODGES, J.R.; MILLWARD-SADLER, G.H.; WRIGHT, R. Chronic active hepatitis: the spectrum of disease. **Lancet**, v.1, p. 550 –552, 1982.

HOMBERG, J.C. et al. Chronic active hepatitis associated with antiliver/kidney microsome antibody type 1: a second type of “autoimmune” hepatitis. **Hepatology**, v.7, p. 1333– 1339, 1987.

HUMPHREY, S.P; WILLIAMSON, R.T. A review of saliva: normal composition, flow, and function. **J. Prosthet. Dent.**, v.85, p. 162-169, 2001.

IKUNO, N.; MACKAY, I.R.; JOIS, J.; OMAGARI, K.; ROWLEY, M.J. Antimitochondrial autoantibodies in saliva and sera from patients with primary biliary cirrhosis. **J. Gastroenter. Hepatol.**, v. 16, p. 1390–1394, 2001.

- INVERNIZZI, P et al. Interpreting serological tests in diagnosing autoimmune liver disease. **Semin. Liver Dis.**, v.27, n.2, p. 161-172, 2007.
- INVERNIZZI, P.; MACKAY, I.R. Autoimmune liver diseases. **World J. Gastroenterol.**, v.14, n.3, p. 290-291, 2008.
- INVERNIZZI, P. Geoepidemiology of autoimmune liver diseases. **J. Autoimmunity**, v. 34, p.300- 306, 2010.
- JENKINS, G.N. **The Physiology of the Mouth**. 3rd ed. London: The Alden Press, 1970.
- JOHNSON, P. J.; MCFARLANE, I.G. Meeting Report: International Autoimmune Hepatitis Group. **Hepatology**, v.18, p. 998-1005, 1993.
- KAUFMAN, E.; LAMSTER, I. B. Analysis of saliva for periodontal diagnosis – a review. **J Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 27, n. 7, p. 453-465, July 2000.
- KARGÜL, B.; YARAT, A.; TANBOGA, I.; EMEKLI, N. Salivary protein and some inorganic element levels in healthy children and their relationship to carie. **J. Marmara Univ. Dent. Fac.**, v. 2, n. 1, p. 434-440, Sept. 1994.
- KINANE, D. F.; LOWE, G. D. How periodontal disease may contribute to cardiovascular disease. **Periodontol. 2000**, Copenhagen, v. 23, n. 1, p. 121-126, June 2000.
- KRAWITT, E.L. Autoimmune hepatitis. **N. Eng. J. Med.**, v.334, p.897-903, 1996.
- KRAWITT, E.L. Autoimmune hepatitis. **N. Engl. J. Med.**, v.354, p. 54-66, 2006.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural proteins during the assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, v. 27, p. 680-685, 1970.
- LAM, K.C. et al. Etiological spectrum of liver cirrhosis in the Chinese. **J. Chron. Dis.**, v.33, p. 375– 381, 1980.
- LAPIERRE, P.; HAJOUI, O.; HOMBERG, J.C.; ALVAREZ, F. Formiminotransferase cyclodeaminase is an organ-specific autoantigen recognized by sera of patients with autoimmune hepatitis. **Gastroenterology**, v.116, p.643–649, 1999.
- LAWRENCE, H. P. Salivary markers of systemic disease: noninvasive diagnostic of disease and monitoring of general health. **J. Can. Dent. Assoc.**, Toronto, v. 68, n. 3, p. 170-174, Mar. 2002.
- LEMONS, L.V.B; SCHIAVON, J.L.N; FERRAZ, M.L.G. Hepatite Auto-imune. **Prática Hospitalar**, v. 52, p.75-80, 2007.
- LENZI, M. et al. Liver cytosolic 1 antigen-antibody system in type 2 autoimmune hepatitis and hepatitis C virus infection. **Gut**, v. 36, p.749–754, 1995.
- LUNEL, F. et al. Liver/kidney microsomes antibody type 1 and hepatitis C virus infection. **Hepatology**, v.16, p.630–636, 1992.

MA, Y. et al. Polyclonal T-cell responses to cytochrome P450IID6 are associated with disease activity in autoimmune hepatitis type 2. **Gastroenterology**, v.130,p.868-882, 2006.

MACKAY, I.R.; MORRIS, P.J. Association of autoimmune active chronic hepatitis with HL-A1,8. **Lancet**, v.2,p. 793 –795,1972.

MAGGIORE, G.; BERNARD, O.; HADCHOUEL, M.; HADCHOUEL, P.; ODIEVRE, M.; ALAGILLE, D. Treatment of autoimmune chronic active hepatitis in childhood. **J. Pediatr.**, v.104, p.839-344, 1984.

MAGGIORE, G.; SCIVERES, M.; CAPRAI, S.; PALLA, G.; UGHI, C. Effectiveness and safety of ciclosporin as therapy for autoimmune diseases of the liver in children and adolescents. **Aliment. Pharmacol. Ther.**, v.19, p.209-217, 2004.

MALAMUD, D. Saliva as a diagnostic fluid. **BMJ**, London, v. 305, n. 6847, p. 207-208, July 1992.

MANDEL, I.D. The function of saliva. **J. Dent. Res.**, v.66, p. 623-627, 1987.

MANDEL, I.D. Impact of saliva on dental caries. **Compend. Suppl.**, p. 476- 481, 1989.

MANDEL, I. D. The diagnostic uses of saliva. **J. Oral Pathol. Med.**, Copenhagen, v. 19, n. 3, p. 119-125, Mar. 1990

MANDEL, I.D. Salivary diagnosis: promises, promises. **Ann. N Y Acad. Sci.**, v. 20, n. 694, p. 1-10, 1993.

MANNS, M. et al. Characterization of a new subgroup of autoimmune chronic active hepatitis by autoantibodies against a soluble liver antigen. **Lancet**, vi, p. 292–294, 1987.

MANNS, M.P. et al. LKM-1 autoantibodies recognize a short linear sequence in P450IID6, a cytochrome P-450 monooxygenase. **J. Clin. Invest.**, v.88, p.1370–1378, 1991.

MANNS, M.P.; KRÜGER, M. Immunogenetics of chronic liver diseases. **Gastroenterology**, v. 106, p. 1676-1697, 1994 .

MANNS, M. Recent Developments in Autoimmune Hepatitis. **J. Gastroenterol. Hepatol.**, v.12, p. 12 256-271, 1997.

MANNS, M.P.; STRASSBURG, C.P. Autoimmune hepatitis: clinical challenges. **Gastroenterology**, v.120, p.1502–1517, 2001.

MATTOS, A. A. et al. Hepatite auto-imune: o que o clínico deve saber. **Rev. AMRIGS**, Porto Alegre, v. 45, n.1/2, p. 51-57, jan./jun 2001.

MBULAITEYE, S. M.; WALTERS, M.; ENGELS, E. A.; BAKAKI, P. M.; NDUGWA, C. M.; OWOR, A. M. et al. High levels of Epstein-Barr virus DNA in saliva and peripheral blood from Ugandan mother-child pairs. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v. 193, n. 3, p. 422-426, Feb. 2006.

MCFARLANE, I.G. The relationship between autoimmune markers and different clinical syndromes in autoimmune hepatitis. **Gut**, v.42, p.599– 602, 1998.

MCFARLANE, I.G. Lessons about antibodies in autoimmune hepatitis. **Lancet**, v.355, p.1475 –1476, 2000.

MCFARLANE, I.G. Definition and Classification of Autoimmune Hepatitis. **Semin. Liver Dis.**,v.22,p.317-324, 2002.

MCFARLANE, I.G. Autoimmune hepatitis: diagnostic criteria, subclassifications, and clinical features. **Clin. Liver Dis.**, v. 6, p. 605–621, 2002.

MERCADO, F. B.; MARSHALL, R. I.; KLESTOV, A. C.; BARTOLD, P. M. Relationship between rheumatoid arthritis and periodontitis. **J. Periodontol.**, Copenhagen, v. 72, n. 6, p. 779-787, June 2001.

MILLER, L. S.; MANWELL, M. A.; NEWBOLD, D.; REDING, M. E.; RASHEED, A.; BLODGETT, J. et al. The relationship between reduction in periodontal inflammation and diabetes control: a report of 9 cases. **J. Periodontol.**, Copenhagen, v. 63, n. 10, p. 843-848, Oct. 1992.

MONTANO-LOZA, A.J.; CARPENTER, H.A.; CZAJA, A.J. Improving the end point of corticosteroid therapy in type 1 autoimmune hepatitis to reduce the frequency of relapse. **Am. J. Gastroenterol.**, v.102, p. 1005-1012, 2007.

MOREIRA, R.K.; REVETTA, F.; KOEHLER, E.; WASHINGTON, M.K. Diagnostic utility of IgG and IgM immunohistochemistry in autoimmune liver disease. **World J. Gastroenterol.**, v.16, n.4, p. 453-457, Jan. 2010.

MORTIMER, P. P.; PARRY, J. V. The use of saliva for viral diagnosis and screening. **Epidemiol. Infect.**, Cambridge, v. 101, n. 2, p. 197-201, Oct. 1988.

MOURA, S. A. B.; MEDEIROS, A. M. C.; COSTA, F. R. H.; MORAES, P.H.; OLIVEIRA FILHO, S. A. Valor Diagnóstico da Saliva em Doenças Orais e Sistêmicas. **Pesq. Bras. Odontoped. Clin. Integr.**, João Pessoa, v. 7, n. 2, p. 187-194, maio/ago. 2007.

NAGLER, R.M.; HERSHKOVICH, O.; LISCHINSKY S; DIAMOND, E.; REZNICK, A.Z;Saliva analysis in the clinical setting: revisiting an underused diagnostic tool. **J. Investig. Med.**, v. 50, n. 3, p. 214–225, 2002.

NAVAZESH, M.; BRIGHTMAN, V.J.; POGODA, J.M. Relationship of medical status, medications, and salivary flow rates in adults of different ages. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v.81, p.172-176,1996.

OLIVEIRA, S. A.; SIQUEIRA, M. M.; BROWN, D. W. G.; LITTON, P.; CAMACHO, L. A. B.; CASTRO, S. T.; COHEN, B. J. Diagnosis of rubella infection by detecting specific immunoglobulin M antibodies in saliva samples: a clinicbased study in Niterói, RJ, Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Brasília, v. 33, n. 4, p. 335-339, July/Aug. 2000.

OLSSON, R. et al. Chronic active hepatitis in Sweden. The etiologic spectrum, clinical presentation, and laboratory profile. **Scand. J. Gastroenterol.**, v.23, p. 463–470, 1988.

PEDERSEN, A.M.L. et al. Salivary changes and dental caries as potential oral markers of autoimmune salivary gland dysfunction in primary Sjögren's syndrome. **BMC Clin. Patol.**, 2005. Disponível em: <http://www.biomedcentral.com/1472-6890/5/4> . Acesso em: 2 Jan. 2012.

PLEBANI, M.; PITTONI, M.; CELADIN, M.; BERNARDI, D.; MION, M.M. Recent advances in diagnostic technologies for autoimmune diseases. **Autoimmun. Rev.**, v.8, p. 238-243, 2009.

PORTA, G.; GAYOTTO, L.C.C.; ALVAREZ, F. Anti-liver-kidney microsome antibody-positive autoimmune hepatitis presenting as fulminant liver failure. **J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.**, v. 11, p. 138-140, 1990.

PORTA, G. Hepatite Auto-Imune. **J. Pediatr.**, v. 76, n. 2, 2000.

POPPER, H.; PARONETTO, F.; SCHAFFNER, F. Immune processes in the pathogenesis of liver disease. **Ann. NY Acad. Sci.**, v.124, p. 781–799, 1965.

PUY, L.C. The role of saliva in maintaining oral health and as an aid to diagnosis. **Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal.** v. 11, p. E449-455, 2006.

RAFEEY, M.; KIANRAD, M.; HASANI, A. Autoimmune hepatitis in iranian children. **Indian J. Gastroenterol.**, v. 26, Jan./Feb. 2007.

RITLAND, S. The incidence of chronic active hepatitis in Norway. A retrospective study. **Scand. J. Gastroenterol.**, v. 20, n. 107, p.58–60, 1985.

RUDNEY, J. D. Saliva and dental plaque. **Adv. Dent. Res.**, Washington, v. 14, n. 1, p. 29-39, Dec. 2000.

RUHL, S.; RAYMENT, S.A.; SCMALZ, G.; HILLER, K.-A.; TROXLER, R.F. F. Proteins in whole saliva during the first year of infancy. **J. Dent. Res.**, v. 84, n. 1, p. 29-34, 2005.

SCANNAPIECO, F. A. Position paper of The American Academy of Periodontology: periodontal disease as a potential risk factor for systemic diseases. **J. Periodontol.**, Copenhagen, v. 69, n. 7, p. 841-850, July 1998.

SCHIPPER, R.G. Saliva as research material: Biochemical, psychochemical and practical aspects. **Arch. Oral Biol.**, v. 52, n. 12, p.1114-1135, 2007

SCHWARZE, C. et al. IgA class Antineutrophil Cytoplasmic Antibodies in Primary Sclerosing Cholangitis and Autoimmune Hepatitis. **Clin. Exp. Immunol.**, v.133, p. 283–289, 2003.

SEVENHUYSEN, G. P.; HOLONDINSKY, C.; DAWES, C. Development of salivary alpha-amilase in infants from birth to 5 months. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 39, p. 584-588, 1984.

SLOMIANY, B.L.; MURTY, V.L.; POITROWSKI, J., SLOMIANY, A. Salivary mucins in oral mucosal defense. **Gen Pharmacol.**, v.27,p.761-771, 1996.

STRECKFUS, C.; BIGLER, L.; DELLINGER, T.; DAI, X.; KINGMAN, A.; TRIGPEN, J. T. The presence of soluble cerbB-2 concentrations in the saliva and serum among women with breast carcinoma: a preliminary study. **Clin. Cancer Res.**, Philadelphia, v. 6, n. 6, p. 2363-2370, June 2000.

STRECKFUS, C.F.; BIGLER, L.R. Saliva as a diagnostic fluid. **Oral Dis.**, v. 8,p. 69–76, 2002.

STUCHELL, R. N.; MANDEL, I. D.; BAURMASH, H. Clinical utilization of sialochemistry in Sjögren's syndrome. **J. Oral Pathol.**, Copenhagen, v. 13, n. 3, p. 303-309, June 1984.

TABAK, L.A. Structure and function of human salivary mucins. **Crit. Rev. Oral Biol. Med.**, v.1, p. 229-234, 1990.

TANG, X.; PAN, Y.; WANG, Z. Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis in whole salivary proteins from patients with adult periodontitis. **Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi**, v. 21, n. 2, p. 98-100, Apr.2003.

TANNER, A.R.; DELLIPIANI, A.W. Chronic active hepatitis: a sixteen year survey at a district general hospital. **Postgrad. Med. J.**, v. 65, p.725–728, 1989.

TENOVUO, J.; LEHTONEN, O-P.J.; AALTONEN, A.S.; VILJA, P.; TUOHIMAA, P. A. Antimicrobial factors in whole saliva of Human Infants. **Infect. Immun.**, v. 51, n. 1, p. 49-53, 1986.

TENOVUO, J.; GRAHN, E.; LEHTONEN, O.-P.; HYYPPÄ, T.; KARHUVAARA, L.; VILJA,P. Antimicrobial Factors in Saliva: Ontogeny and Relation to Oral Health. **J. Dent. Res.**, v. 66, n. 2, p. 475-479, 1987.

TENOVUO, J. Antimicrobial function of human saliva – how important is it for oral health? **Acta Odontol. Scand.**, Oslo, v.56, n. 5, p. 250-256, Oct. 1998.

TERPENNING, M. S.; TAYLOR, G. W.; LOPATIN, D. E.; KERR, C. K.; DOMINGUEZ, B. L.; LOESCHE, W. J. Aspiration pneumonia: dental and oral risk factors in an order veteran population. **J. Am. Geriatr. Soc.**, New York, v. 49, n. 5, p. 557-563, May, 2001.

TISHLER, M.; YAHRON, I.; SHIRAZI, I.; LEVARTOVSKY, D.; YARON, M. Salivary and serum soluble interleukin-2 receptor in primary Sjögren's syndrome. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v. 44, n. 4, p. 305-308, Apr. 1999.

TODA, G. et al. Present status of autoimmune hepatitis in Japan—correlating the characteristics with international criteria in an area with a high rate of HCV infection. **J. Hepatol.**, v.26, p.1207–1212, 1997.

TREICHEL, U. et al. Demographics of anti-asialo-glycoprotein receptor autoantibodies in autoimmune hepatitis. **Gastroenterology**, v.107, p.799–804, 1994.

VERGANI, D. et al. Genetically determined low C4: a predisposing factor to autoimmune chronic active hepatitis. **Lancet**, v.2, p. 294–298, 1985

VERGANI D.; MIELI, G.V. Mechanisms of autoimmune hepatitis. **Pediatr. Transplant.**, v.8, p.589–593, 2004.

VERGANI, D.; MIELI-VERGANI, G. Autoimmune hepatitis: diagnostic and management challenges. **J. Gastroenterol. Hepatol.**, v.19, p.388-390, 2004.

VERGANI, D.; MIELI, G. Autoimmune paediatric liver disease. **World J. Gastroenterol.**, v. 14, n.21, p. 3360-3367, june 2008.

VYSE, A. J.; BROWN, D. W. G.; COHEN, B. J.; SAMUEL, R.; NOKES, D. J. Detection of rubella virus-specific immunoglobulin G in saliva by an amplification-based enzyme-linked immunosorbent assay using monoclonal antibody to fluorescein isothiocyanate. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 37, n. 2, p. 391-395, Feb. 1999.

WIES, I. et al. Identification of target antigen for SLA/LP autoantibodies in autoimmune hepatitis. **Lancet**, v.355, p.1510–1515, 2000.

WONG, D.T. Salivary diagnostics for oral cancer. **J. Calif. Dent. Assoc.**, v.34, n.4, p. 303-308, 2006.

YAO, Y.; BERG, E.A.; COSTELLO, C.E.; TROXLER, R.F.; OPPENHEIM, F.G. Identification of protein components in human acquired enamel pellicle and whole saliva using novel proteomics approaches. **J. Biol. Chem.**, v. 14, n. 7, p. 5300-5308, 2003.

APÊNDICE A : TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
“NÍVEIS DE IMUNOGLOBULINAS NA SALIVA DE CRIANÇAS E
ADOLESCENTES PORTADORES DE HEPATITE AUTO-IMUNE.”

Seu filho ou filha está sendo convidado a participar como voluntário de uma pesquisa. Sua participação é importante, porém, ele (a) não deve participar contra vontade própria ou contra a sua vontade. Leia com atenção as informações abaixo, sentindo-se livre para fazer qualquer pergunta que desejar, para que não haja dúvida alguma sobre os procedimentos a serem realizados.

Ao assinar este termo que consta de seu nome, nome de seu filho ou filha, idade, e número do prontuário, você estará declarando que por meio de livre e espontânea vontade sua e de seu filho ou filha, ele (a) estará participando como voluntário do projeto de pesquisa citado acima, de responsabilidade da Cirurgiã-Dentista Juliana Ximenes Damasceno da Faculdade de Odontologia, da Universidade Federal do Ceará. O abaixo-assinado estará ciente que:

- a) O objetivo da pesquisa é verificar se existe alguma diferença entre a saliva de uma criança com hepatite auto-imune e a de outra sem hepatite auto-imune.
- b) Durante o estudo você deverá fornecer informação sobre o estado geral de saúde do seu filho ou filha.
- c) A participação neste estudo consistirá de um exame dentário de seu filho ou filha para verificar os dentes presentes na boca e o tipo de cárie que ele (a) possa ter, e da coleta de saliva.
- d) Nem a coleta de saliva, nem o exame odontológico ocasionarão DOR ao seu filho ou filha.
- e) Uma amostra de saliva será colhida conforme segue:
 - Na amostra, haverá coleta da saliva já presente na boca do seu filho ou filha com o uso de uma pequena cânula (semelhante a um pequeno pedaço de borracha), enquanto se encontra em repouso no seu colo.
 - Para que seja feita a coleta é preciso que seu filho ou filha, esteja em jejum por no mínimo 3 horas, e que tenha escovado os dentes uma hora antes da consulta.
- f) Seu filho ou filha NÃO RECEBERÁ INJEÇÃO de anestésico local.
- g) Essa saliva após recolhida será analisada para que se possa verificar as imunoglobulinas e os auto - anticorpos.
- h) Você tem a liberdade de desistir ou interromper a participação do seu filho ou filha neste estudo no momento que desejar, sem necessidade de qualquer explicação.
- i) A participação neste estudo lhe dá o direito do seu filho ou filha ter, sem custos, profilaxia (limpeza dos dentes) e aplicação tópica de flúor para a prevenção, evitando novas cáries.

- j) Os resultados obtidos durante este estudo serão mantidos em sigilo. Não haverá identificação por ocasião da exposição e/ou publicação dos mesmos.
- k) É condição indispensável para participação no estudo que seu filho ou filha não tenha nenhuma doença crônica e, portanto, não esteja no momento sob tratamento médico ou fazendo uso crônico de drogas ou medicações.
- l) O surgimento de resfriados ou viroses, com conseqüente uso de medicações por período de tempo limitado, não exclui seu filho ou filha do estudo.
- m) Caso venham a surgir dúvidas ou perguntas, sinta-se livre para contactar a Cirurgiã-Dentista. Juliana Ximenes Damasceno (responsável pelo projeto) na Faculdade de Odontologia (sala 1), rua Monsenhor Furtado, s/n, Rodolfo Teófilo ou nos telefones 3366 8408 / 88540254. Pode-se ainda contactar o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Walter Cantídio na Rua Capitão Francisco Pedro 1290, Rodolfo Teófilo ou no telefone 3366 8589 ou por e mail: cephuwc@huwc.ufc.br para informar qualquer questionamento durante a participação no estudo sobre a ética da pesquisa.

O abaixo – assinado _____, ____ anos, RG nº _____ declara que é de livre e espontânea vontade que está participando como voluntário da pesquisa. Eu declaro que li cuidadosamente este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e que, após sua leitura, tive a oportunidade de fazer perguntas sobre o conteúdo do mesmo, como também sobre a pesquisa e recebi explicações que responderam por completo minhas dúvidas. E declaro ainda estar recebendo uma cópia assinada deste Termo.

Fortaleza, _____

_____	_____	_____
Nome do voluntário	Data	Assinatura
_____	_____	_____
Nome do pesquisador	Data	Assinatura
_____	_____	_____
Nome da testemunha	Data	Assinatura
_____	_____	_____
Nome do profissional que aplicou o TCLE	Data	Assinatura

APÊNDICE B: FICHA DE ANAMNESE
DADOS PESSOAIS

NOME _____

IDADE _____ DATA DE NASCIMENTO _____

NOME DO PAI _____

NOME DA MÃE _____

RESPONSÁVEL LEGAL _____

ENDEREÇO _____

TELEFONE PARA CONTATO _____

NOME DA ESCOLA _____

ENDEREÇO DA ESCOLA _____

ESTADO DE SAÚDE GERAL DA CRIANÇA

FAVOR LER E RESPONDER COM ATENÇÃO.

1) O seu filho ou filha se encontra sob tratamento médico? SIM NÃO

Para que? Caso a sua resposta tenha sido SIM. _____

2) O seu filho ou filha tem alguma doença crônica? SIM NÃO

Qual? Caso a sua resposta tenha sido SIM. _____

3) O seu filho ou filha está tomando algum remédio? SIM NÃO

Quais? Caso a sua resposta tenha sido SIM. _____

4) O seu filho ou filha tem algum tipo de alergia? SIM NÃO

A que? Caso a sua resposta tenha sido SIM. _____

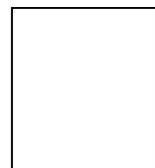
5) O seu filho ou filha esteve recentemente hospitalizado?SIM NÃO

Para que? Caso a sua resposta tenha sido SIM. _____

Afirmo que as informações acima são verdadeiras.

Data: _____

Assinatura: _____



APÊNDICE C: FICHA DE EXAME DENTÁRIO

NOME DA CRIANÇA _____

IDADE _____ DATA DE NASCIMENTO _____

DATA _____

EXAME EXTRA-ORAL

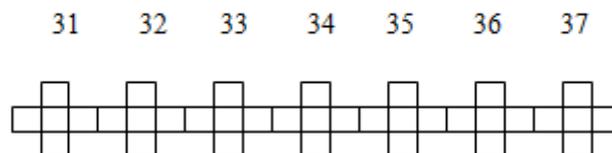
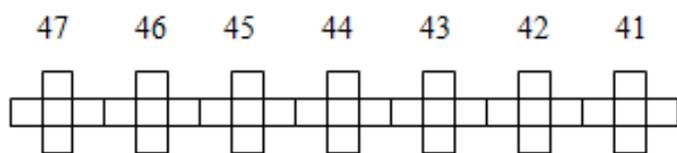
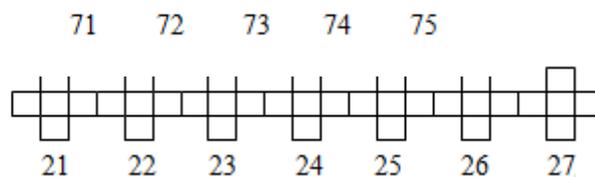
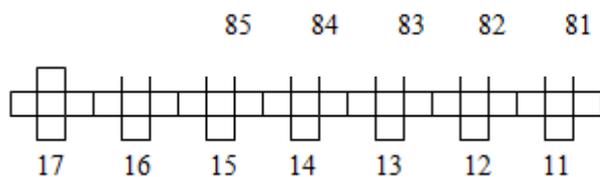
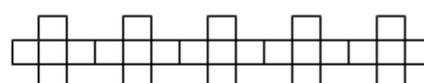
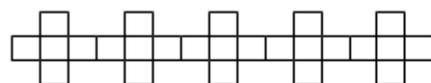
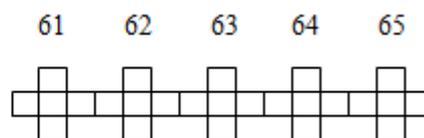
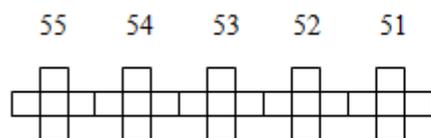
LINFADENOPATIA: PRESENTE AUSENTE

ASSIMETRIA FACIAL POR INFECÇÃO: PRESENTE AUSENTE

EXAME INTRA-ORAL

TECIDOS MOLES: NORMAIS PATOLÓGICOS

EXAME DENTÁRIO



- Cor vermelha – corresponde a superfícies cariadas
- Cor azul – corresponde a superfícies restauradas
- X – corresponde a superfícies ausentes devido à cárie

COMENTÁRIOS: _____

ANEXO A: Aprovação do Comitê de Ética



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
 HOSPITAL UNIVERSITÁRIO WALTER CANTÍDIO
 COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
 Rua Capitão Francisco Pedro, 1290 – Rodolfo Teófilo – 60.430-370 – Fortaleza-CE
 FONE: (85) 3366-8589 / 3366-8613 E-MAIL: cephuwc@huwc.ufc.br

HUWC/CEP
 Comitê de Ética em Pesquisa
 Cód CEP- 028.03.11

Protocolo nº: 028.03.11

Pesquisador(a) Responsável: Juliana Ximenes Damasceno
 Departamento / Serviço: Laboratório de Farmacologia Metabólica e Fisiologia
 Celular/Plaquetas - UFC + Laboratório de Bioquímica Humana (UECE) + Ambulatório de
 Hepatologia Pediátrica do HUWC.
 Título do Projeto: “Níveis de Imunoglobinas e Anticorpos Antinucleares na Saliva de
 Crianças e Adolescentes Portadores de Hepatite Auto-Imune.”

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Walter Cantídio analisou na reunião do dia 25/04/2011 o projeto de pesquisa supracitado e baseando-se nas normas que regulamentam a pesquisa em seres humanos, do Conselho Nacional de Saúde (Resoluções CNS 196/96, 251/97, 292/99, 303/00, 304/00, 347/05, 346/05), resolveu classificá-lo como: **APROVADO**.

Salientamos a necessidade de apresentação de relatório ao CEP-HUWC da pesquisa dentro de 12 meses (data prevista: 28 /04/2012).

Fortaleza, 28 de Abril de 2011.


 Dra. Maria de Fátima de Souza
 Coordenadora do CEP - HUWC

ANEXO B : Proteínas salivares

Tabela 9: Lista de proteínas salivares com peso molecular na faixa de 20, 1 a 14,4 kDa.

CÓDIGO DE ACESSO	PESO MOLECULAR	PROTEÍNA
AGR2_HUMAN	20.0 kDa	O95994 Anterior gradient protein 2 homolog precursor.
AGR3_HUMAN	19.2 kDa	Q8TD06 Anterior gradient protein 3 homolog precursor.
ANGI_HUMAN	16.6 kDa	P03950 Angiogenin precursor.
APT_HUMAN	19.5 kDa	P07741 Adenine phosphoribosyltransferase.
ARF6_HUMAN	20.0 kDa	P62330 ADP-ribosylation factor 6.
ARPC4_HUMAN	19.5 kDa	P59998 Actin-related protein 2/3 complex subunit.
ARPC5_HUMAN	16.2 kDa	O15511 Actin-related protein 2/3 complex subunit 5.
ATP5H_HUMAN	18.4 kDa	O75947 ATP synthase D chain, mitochondrial.
CALL3_HUMAN	16.8 kDa	P27482 Calmodulin-related protein NB-1.
CALM_HUMAN	16.7 kDa	P62158 Calmodulin.
CDD_HUMAN	16.2 kDa	P32320 Cytidine deaminase.
CG38_HUMAN	19.0 kDa	Q9BW30 Protein CGI-38.
COF1_HUMAN	18.4 kDa	P23528 Cofilin-1.
COF2_HUMAN	18.7 kDa	Q9Y281 Cofilin-2.
COX41_HUMAN	19.6 kDa	P13073 Cytochrome c oxidase subunit IV isoform 1, mitochondrial precursor.
COX5A_HUMAN	16.8 kDa	P20674 Cytochrome c oxidase polypeptide 5a, mitochondrial precursor.
CS010_HUMAN	18.8 kDa	Q969H8 Protein C19orf10 precursor.

CUTA_HUMAN	19.1 kDa	O60888 Protein CutA precursor .
CYB5M_HUMAN	16.3 kDa	O43169 Cytochrome b5 outer mitochondrial membrane isoform precursor.
CYTC_HUMAN	15.8 kDa	P01034 Cystatin C precursor.
CYTD_HUMAN	16.1 kDa	P28325 Cystatin D precursor.
CYTN_HUMAN	16.4 kDa	P01037 Cystatin SN precursor .
CYTS_HUMAN	16.2 kDa	P01036 Cystatin S precursor.
CYTT_HUMAN	16.4 kDa	P09228 Cystatin SA precursor.
DEST_HUMAN	18.4 kDa	P60981 Destrin.
ECP_HUMAN	18.4 kDa	P12724 Eosinophil cationic protein precursor.
FABPE_HUMAN	15.0 kDa	Q01469 Fatty acid-binding protein, epidermal.
FAL39_HUMAN	19.3 kDa	P49913 Antibacterial protein FALL-39 precursor.
FKB1A_HUMAN	11.8 kDa	P62942 FK506-binding protein 1A.
GAPR1_HUMAN	17.1 kDa	Q9H4G4 Golgi-associated plant pathogenesis-related protein 1.
GMFB_HUMAN	16.6 kDa	P60983 Glia maturation factor beta.
GMFG_HUMAN	16.8 kDa	O60234 Glia maturation factor gamma .
H2AX_HUMAN	15.0 kDa	P16104 Histone H2A.x.
H3B_HUMAN	15.2 kDa	Q93081 Histone H3/b.
H3T_HUMAN	15.4 kDa	Q16695 Histone H3.4.
HBA_HUMAN	15.1 kDa	P69905 Hemoglobin alpha chain.
HBB_HUMAN	15.9 kDa	P68871 Hemoglobin beta chain.
HBD_HUMAN	15.9 kDa	P02042 Hemoglobin delta chain.
HBE_HUMAN	16.1 kDa	P02100 Hemoglobin epsilon chain.
HBG1_HUMAN	16.0 kDa	P69891 Hemoglobin gamma-1 chain .

HBG2_HUMAN	16.0 kDa	P69892 Hemoglobin gamma-2 chain.
HV2I_HUMAN	16.2 kDa	P06331 Ig heavy chain V-II region ARH-77 precursor.
IF1AX_HUMAN	16.3 kDa	P47813 Eukaryotic translation initiation factor 1A, X-chromosomal.
IF1AY_HUMAN	16.3 kDa	O14602 Eukaryotic translation initiation factor 1A, Y-chromosomal.
IF5A_HUMAN	16.7 kDa	P63241 Eukaryotic translation initiation factor 5A.
IGJ_HUMAN	15.6 kDa	P01591 Immunoglobulin J chain.
IL1F5_HUMAN	17.0 kDa	Q9UBH0 Interleukin 1 family member 5.
IL1F6_HUMAN	17.7 kDa	Q9UHA7 Interleukin 1 family member 6.
IL1F9_HUMAN	18.7 kDa	Q9NZH8 Interleukin 1 family member 9.
IL1RA_HUMAN	20.1 kDa	P18510 Interleukin-1 receptor antagonist protein precursor.
KR131_HUMAN	18.3 kDa	Q8IUC0 Keratin-associated protein 13-1.
KV2F_HUMAN	14.7 kDa	P06310 Ig kappa chain V-II region RPMI 6410 precursor.
KV4B_HUMAN	14.6 kDa	P06313 Ig kappa chain V-IV region JI precursor.
KV4C_HUMAN	15.0 kDa	P06314 Ig kappa chain V-IV region B17 precursor.
LEG7_HUMAN	14.9 kDa	P47929 Galectin-7.
LYSC_HUMAN	16.5 kDa	P61626 Lysozyme C precursor .
MLE3_HUMAN	16.6 kDa	P06741 Myosin light chain 3, skeletal muscle isoform.
MLRM_HUMAN	19.7 kDa	P19105 Myosin regulatory light chain 2, nonsarcomeric .

MLRN_HUMAN	19.7 kDa	P24844 Myosin regulatory light chain 2, smooth muscle isoform.
MYL6_HUMAN	16.8 kDa	P60660 Myosin light polypeptide 6.
NDK8_HUMAN	15.5 kDa	O60361 Putative nucleoside diphosphate kinase.
NDKA_HUMAN	17.1 kDa	P15531 Nucleoside diphosphate kinase A.
NDKB_HUMAN	17.3 kDa	P22392 Nucleoside diphosphate kinase B.
NPC2_HUMAN	16.6 kDa	P61916 Epididymal secretory protein E1 precursor.
PA2GA_HUMAN	16.1 kDa	P14555 Phospholipase A2, membrane associated precursor.
PARK7_HUMAN	19.9 kDa	Q99497 DJ-1 protein .
PIP_HUMAN	16.6 kDa	P12273 Prolactin-inducible protein precursor .
PLP2_HUMAN	16.7 kDa	Q04941 Proteolipid protein 2.
PPIA_HUMAN	17.9 kDa	P62937 Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A.
PROF1_HUMAN	14.9 kDa	P07737 Profilin-1.
RABP2_HUMAN	15.6 kDa	P29373 Retinoic acid-binding protein II, cellular.
RBM3_HUMAN	17.2 kDa	P98179 Putative RNA-binding protein 3.
RL11_HUMAN	20.1 kDa	P62913 60S ribosomal protein L11.
RL12_HUMAN	17.8 kDa	P30050 60S ribosomal protein L12.
RL22_HUMAN	14.7 kDa	P35268 60S ribosomal protein L22 .
RL23_HUMAN	14.9 kDa	P62829 60S ribosomal protein L23.
RL23A_HUMAN	17.7 kDa	P62750 60S ribosomal protein L23a.
RL26_HUMAN	17.3 kDa	P61254 60S ribosomal protein L26.

RL26L_HUMAN	17.3 kDa	Q9UNX3 60S ribosomal protein L26-like 1.
RL27A_HUMAN	16.4 kDa	P46776 60S ribosomal protein L27a.
RL29_HUMAN	17.6 kDa	P47914 60S ribosomal protein L29 .
RL32_HUMAN	15.7 kDa	P62910 60S ribosomal protein L32.
RNAS2_HUMAN	18.4 kDa	P10153 Nonsecretory ribonuclease precursor.
RNAS4_HUMAN	16.8 kDa	P34096 Ribonuclease 4 precursor.
RS11_HUMAN	18.4 kDa	P62280 40S ribosomal protein S11.
RS13_HUMAN	17.1 kDa	P62277 40S ribosomal protein S13.
RS14_HUMAN	16.1 kDa	P62263 40S ribosomal protein S14.
RS15_HUMAN	16.9 kDa	P62841 40S ribosomal protein S15 .
RS15A_HUMAN	14.7 kDa	P62244 40S ribosomal protein S15a.
RS16_HUMAN	16.3 kDa	P62249 40S ribosomal protein S16.
RS17_HUMAN	15.4 kDa	P08708 40S ribosomal protein S17.
RS18_HUMAN	17.7 kDa	P62269 40S ribosomal protein S18.
RS19_HUMAN	15.9 kDa	P39019 40S ribosomal protein S19.
RS23_HUMAN	15.7 kDa	P62266 40S ribosomal protein S23.
RS24_HUMAN	15.4 kDa	P62847 40S ribosomal protein S24.
SKP1_HUMAN	18.5 kDa	P63208 S-phase kinase-associated protein 1A.
SODC_HUMAN	15.8 kDa	P00441 Superoxide dismutase [Cu-Zn].
SPRR3_HUMAN	18.2 kDa	Q9UBC9 Small proline-rich protein 3.
SSB_HUMAN	17.3 kDa	Q04837 Single-stranded DNA-binding protein, mitochondrial precursor.
TCTP_HUMAN	19.6 kDa	P13693 Translationally controlled tumor protein.
TTHY_HUMAN	15.9 kDa	P02766 Transthyretin precursor.

UB2D2_HUMAN	16.7 kDa	P62837 Ubiquitin-conjugating enzyme E2 D2.
UB2D3_HUMAN	16.7 kDa	P61077 Ubiquitin-conjugating enzyme E2 D3.
UB2G1_HUMAN	19.4 kDa	P62253 Ubiquitin-conjugating enzyme .
UB2V2_HUMAN	16.2 kDa	Q15819 Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 2.
UBE2N_HUMAN	17.1 kDa	P61088 Ubiquitin-conjugating enzyme E2 N.
VEGP_HUMAN	19.3 kDa	P31025 Von Ebner's gland protein precursor.

Fonte: FANG, X. et al. Comparison of electrokinetics-based multidimensional separations coupled with electrospray ionization-tandem mass spectrometry for characterization of human salivary proteins. *Anal Chem.*, v. 79, n. 15, p. 5785-5792, Aug 2007.

ANEXO C: Proteínas salivares

Tabela 10: Lista de proteínas salivares com peso molecular em torno de 14,4 kDa.

CÓDIGO DE ACESSO	PESO MOLECULAR	PROTEÍNA
KV3H_HUMAN	14.3 kDa	P04207 Ig kappa chain V-III region CLL precursor.
KV3L_HUMAN	14.1 kDa	P18135 Ig kappa chain V-III region HAH precursor.
KV3M_HUMAN	14.0 kDa	P18136 Ig kappa chain V-III region HIC precursor.
LACRT_HUMAN	14.2 kDa	Q9GZZ8 Extracellular glycoprotein lacritin precursor.
NTF2_HUMAN	14.5 kDa	P61970 Nuclear transport factor 2.
RL31_HUMAN	14.5 kDa	P62899 60S ribosomal protein L31.
RL35_HUMAN	14.4 kDa	P42766 60S ribosomal protein L35.
RS12_HUMAN	14.4 kDa	P25398 40S ribosomal protein S12.
TCP4_HUMAN	14.3 kDa	P53999 Activated RNA polymerase II transcriptional coactivator p15.

Fonte: FANG, X. et al. Comparison of electrokinetics-based multidimensional separations coupled with electrospray ionization-tandem mass spectrometry for characterization of human salivary proteins. *Anal Chem.*, v. 79, n. 15, p. 5785-5792, Aug 2007.