



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

IÊDA MARIA ROCHA LIMA VIEIRA DA FONSECA

**AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS NA SALIVA
HUMANA FRENTE A DIFERENTES PROTOCOLOS DE TRATAMENTO DA
SALIVA**

FORTALEZA

2015

IÊDA MARIA ROCHA LIMA VIEIRA DA FONSECA

**AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS NA SALIVA
HUMANA FRENTE A DIFERENTES PROTOCOLOS DE TRATAMENTO DA
SALIVA**

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

Área de concentração: Clínica Odontológica.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Cristiane Sá Roriz
Fonteles

Co-orientador: Prof. Dr. Cauby Maia Chaves
Junior

Fortaleza

2015

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

-
- F742a Fonseca, Iêda Maria Rocha Lima Vieira da.
Avaliação da concentração de proteínas totais na saliva humana frente a diferentes protocolos de tratamento da saliva / Iêda Maria Rocha Lima Vieira da Fonseca. – 2015. 37 f. : il.
- Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Departamento de Clínica Odontológica, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Mestrado em Odontologia, Fortaleza, 2015.
Área de Concentração: Clínica Odontológica.
Orientação: Profa. Dra. Cristiane Sá Roriz Fonteles.
Coorientação: Prof. Dr. Cauby Maia Chaves Junior.
1. Saliva. 2. Proteínas. 3. Temperatura Ambiente. 4. Inibidores de Proteases. 5. Perfis de Fluxo. I. Título.

CDD 617.6

IÊDA MARIA ROCHA LIMA VIEIRA DA FONSECA

**AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS NA SALIVA
HUMANA FRENTE A DIFERENTES PROTOCOLOS DE TRATAMENTO DA
SALIVA**

Dissertação apresentada á Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial na obtenção do título de Mestre em Odontologia.

[Digite uma citação do documento ou o resumo de uma questão interessante. Você pode posicionar a caixa de texto em qualquer lugar do documento. Use a guia Ferramentas de Caixa de Texto para alterar a formatação da caixa de texto da citação.]

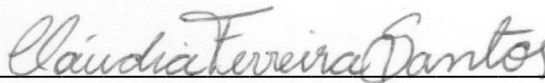
Aprovada em: *29/05/2015*

BANCA EXAMINADORA:



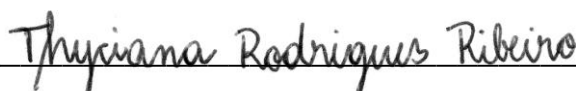
Prof^a. Dra. Cristiane Sá Roriz Fonteles (Orientadora)

Universidade Federal do Ceará



Prof^a. Dra. Cláudia Ferreira Santos

Universidade Estadual do Ceará



Prof^a. Dra. Thyciana Rodrigues Ribeiro

Universidade Federal do Ceará

Dedico este trabalho aos extremos da minha família:
Ao meu pai, Paulo, que durante toda sua vida terrena, me
apoiou sempre.
À minha mãe, Estephania, que do alto dos seus 95 anos,
continua me incentivando a ir em frente.
Às minhas netas, Liz e Alice que durante este período, não
tiveram a vovó como desejavam.

AGRADECIMENTOS

A Deus, e a toda Sua Corte Celestial, que me guiam, amparam, confortam e me fazem sentir completa em sua companhia.

Ao meu marido Sergio, meus filhos, Enio, Daniel e Lea, minhas noras Monika e Veridiana, e toda minha família, que acreditam que sou, realmente, capaz de realizar todos os meus sonhos.

À Professora Cristiane Sá Roriz Fonteles, que me incentivou a olhar para frente e dar mais um passo na direção do crescimento.

Ao Professor Cauby Maia Chaves Junior, que sempre foi um grande mestre, exemplo de garra e competência.

À Professora Thyciana Rodrigues Ribeiro, que me acompanhou nesta jornada, sempre de braços abertos para acolher e ajudar.

Ao Professor Fabio Wildson Gurgel Costa, um exemplo de colaboração, disponibilidade e acolhimento, como todo mestre deve ser.

À Professora Claudia Ferreira Santos e ao Professor Nilberto Robson Nascimento, que me ajudaram, abrindo as portas do Laboratório de Pesquisa de Fisiologia e Farmacologia Cardiovascular e Renal da Universidade Estadual do Ceará-UECe, e, muito gentilmente, aceitaram fazer parte da banca de defesa deste mestrado.

À Sra. Vania Monteiro Soares, revisora oficial, que acreditou que eu chegaria até aqui e prontificou-se, desde o princípio, a fazer esta revisão. Obrigada, minha prima, por me apoiar neste momento.

Aos participantes do Grupo de pesquisa em saliva da UFC, que estiveram comigo em horas críticas, mas que, com bom humor, adoçaram estes momentos.

Aos voluntários, doadores desta pesquisa, que gentilmente aceitaram colaborar.

Realizar este sonho seria impossível sem o apoio e incentivo do Professor Pedro Cesar Fernandes dos Santos, e da minha amiga, Marta Teixeira, presentes no meu dia a dia da faculdade

Aos companheiros na clínica e na disciplina Ortodôntico-Pediátrica, do Curso de Odontologia da UFC, pois nossa amizade foi muito importante durante este período.

Aos professores e colegas do Programa de Pós-Graduação em Odontologia

da UFC, que iniciaram a lapidação deste título que agora me proponho a defender.

Às funcionárias do PPGO, Lucia e Janaína.

Às amigas de todas as horas, Glaucides Barros, Auri Bitu e Sheilimar Magalhaes, pelo apoio irrestrito em todas as horas.

Um agradecimento sincero a todos que fazem o Departamento de Clínica Odontológica da FFOE, UFC.

Meus sinceros agradecimentos aos amigos que, embora não citados, foram importantes nesta caminhada.

LEMBRANÇAS MARAVILHOSAS FICARÃO EM MINHA MEMÓRIA!!!!

Se as coisas são inatingíveis
oras, não é motivo para não querê-las!
Que tristes os caminhos,
se não fora a presença distante das estrelas!

Mario Quintana

RESUMO

A necessidade de preservar a estabilidade da saliva durante e/ou depois da coleta, tem sido considerado um fator que pode influenciar os resultados obtidos na análise desse fluido, comprometendo a confiabilidade e reprodutibilidade de tais métodos analíticos. Os principais desafios relacionados à preservação da saliva referem-se à complexidade da sua composição e da sua elevada atividade proteolítica inerente. Consequentemente, coleta e armazenamento da saliva exigem precauções especiais para preservação de seus componentes. O presente estudo se propôs a avaliar a concentração proteica de amostras de saliva total de dez voluntários adultos, saudáveis, com idades variando de 23 a 65 anos, com média de 31 anos submetidas a alterações metodológicas no preparo pré-analítico da amostra. Após coletadas, os fluxos salivares foram calculados e as amostras de saliva de cada indivíduo foram fracionadas e divididas em seis diferentes grupos, onde cada um desses grupos correspondeu a um tipo diferente de preparo pré-analítico da amostra. Os grupos foram conforme segue: G1- centrifugação imediata, inibidor ausente, temperatura ambiente por 24 horas; G2- centrifugação imediata, inibidor ausente, -80°C por 30 dias; G3- centrifugação imediata, inibidor no ato da coleta, -80°C por 30 dias; G4- centrifugação imediata, inibidor no ato da análise, -80°C por 30 dias; G5- centrifugação após 30 dias, inibidor ausente, -80°C por 30 dias; G6- centrifugação após 30 dias, inibidor no ato da análise, -80°C por 30 dias. As concentrações de proteínas totais foram avaliadas pelo método do ácido bicinconínico, em duplicatas. Após análise a concentração de proteínas totais em cada grupo foi estatisticamente correlacionada pelos testes de Pearson e Spearman, e comparações feitas realizadas por meio do teste ANOVA para medidas repetidas ($p < 0,05$). As concentrações médias de proteínas totais demonstraram uma correlação negativa significativa com o fluxo salivar em G1 ($P = 0,020$), G4 ($P = 0,027$) e G5 ($P = 0,05$). Proteínas totais e idade só demonstraram correlação significativa em G3 ($P = 0,01$). As concentrações de proteínas totais médias não diferiram de forma significativa entre os grupos, $F(5,45) = 1,132$, $P = 0,358$. Esses resultados foram, também, observados ao se comparar as médias de proteínas totais com base no fluxo salivar dos voluntários, $F(5,45) = 2,068$, $P = 0,087$. Em conclusão, as alterações metodológicas ora propostas no tratamento das amostras de saliva não redundaram em alterações quantitativas significantes nas

concentrações de proteínas totais presentes nesse fluido.

Palavras chave: Saliva. Proteínas totais. Temperatura; Inibidores de protease, Fluxo salivar

ABSTRACT

The need to preserve the stability of saliva samples during and/or after collection has been considered a factor that might influence its analytical results, compromising the reliability and reproducibility of these analytical methods. The main challenges related to saliva preservation include the complexity of saliva composition, and its inherent elevated proteolytic activity. Thus, collection and storage of saliva requires specific precautions to preserve its components. The present study aimed to evaluate the protein concentration of saliva samples obtained from 10 healthy adults, aged 23 – 65 years, with a mean age of 31 years, subject to different pre-analytical sample preparation. Following collection, the salivary flow rate was calculated, and saliva samples from each volunteer were fractioned and divided in six different groups, in which each of these groups corresponded to a different type of pre-analytical sample preparation. The groups were as follows: G1- immediate centrifugation, no addition of protease inhibitor, room temperature during 24 hours; G2- immediate centrifugation, no addition of protease inhibitor, -80°C during 30 days; G3- immediate centrifugation, protease inhibitor added during collection, -80°C during 30 days; G4- immediate centrifugation, protease inhibitor added during analysis, -80°C during 30 days; G5- centrifugation 30 days after collection, no addition of protease inhibitor, -80°C during 30 days; G6- centrifugation 30 days after collection, protease inhibitor added during analysis, -80°C during 30 days. Total protein concentration was analyzed in duplicates, through the bicinchoninic acid assay. After analysis, the total protein concentration in each group was statistically correlated through Pearson and Spearman correlation tests and compared using repeated measure ANOVA ($p < 0.05$). The mean total protein concentrations showed a negative correlation with salivary flow rate in G1 ($P = 0,020$), G4 ($P = 0,027$) and G5 ($P = 0,05$). Total protein concentration and age were only statistically correlated in G3 ($P = 0,01$). The mean total protein concentrations did not significantly differ between groups, $F(5,45) = 1,132$, $P = 0,358$. These results were also observed when comparing the mean total protein concentrations normalized by each individual's salivary flow rate, $F(5,45) = 2,068$, $P = 0,087$. In conclusion, the methodological alterations proposed for the preparation of saliva samples before analysis did not generate significant quantitative alterations in total protein concentration within these samples.

Key-words: Saliva; Total proteins; Temperature; Protease inhibitors, Salivary flow rate.

LISTA DE ABREVIATURAS

DNA- Ácido Desoxirribonucléico

NIDCR- National Institute of Dental Craniofacial Research – Instituto Nacional de Odontologia e Pesquisas Craniofaciais (USA)

mRNA- RNA mensageiro

DSTA- Direct Saliva Transcriptomic Analysis- Análise transcriptômica direta da saliva

IgA1- Imunoglobulina A

PIBIC- Programa Institucional de Bolsas de Iniciação científica.

ml- Mililitro

G- rotações

BCA- Ácido Bicinconínico

BSA- Albumina sérica bovina

Nm- Namômetro

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.**28
Médias marginais estimadas de proteínas totais para os diferentes grupos de tratamento da saliva.
- Figura 2.** 28
Médias marginais estimadas de proteínas totais ajustadas com base no fluxo salivar para os diferentes grupos de tratamento da saliva.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	24
Grupos experimentais segundo os diferentes protocolos de tratamento das amostras de saliva	
Tabela2.	25
Estatística básica dos dados da pesquisa referente a 10 (dez) voluntários sadios.	
Tabela 3.	26
Teste de Shapiro-Wilk para avaliação da distribuição dos dados.	
Tabela 4.	27
Comparação entre os diferentes grupos de tratamento da saliva com relação a variável concentração total média de proteínas, através do teste ANOVA para medidas repetidas ($p < 0,05$).	
Tabela 5.	28
Comparação entre os diferentes grupos de tratamento da saliva com relação à variável concentração total de proteínas ajustadas com base no fluxo salivar, através do teste ANOVA para medidas repetidas ($P < 0,05$).	

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. HIPÓTESES TESTADAS	19
2.1. Hipótese nula	19
2.2. Hipótese alternativa	19
3. OBJETIVOS	20
3.1. Objetivo Geral	20
3.2. Objetivos específicos	20
4. MATERIAIS E MÉTODOS	21
4.1. Considerações éticas	21
4.2. Desenho do estudo	21
4.3. Amostra	21
4.4. Critérios de inclusão	22
4.5. Critérios de exclusão	22
4.6. Critérios de retirada	22
4.7. Examinadores	22
4.8. Protocolo clínico	22
4.8.1. Anamnese	22
4.8.2. Coleta de saliva	23
4.9. Protocolo analítico	24
4.9.1. Mensuração do fluxo salivar	24
4.9.2. Dosagem de proteínas totais salivares pelo método do ácido bicinconínico- BCS	24
4.10. Análise estatística	24
5. RESULTADOS	25
5.1. Avaliação da normalidade dos dados	25
5.2. Avaliação da correlação entre os grupos	26
5.3. Comparação entre os grupos	27
6. DISCUSSÃO	29
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	32
REFERÊNCIAS	33

1. INTRODUÇÃO

A combinação de emergentes biotecnologias ampliou o leque de diagnósticos a partir da cavidade oral para todo o sistema fisiológico, uma vez que a maioria dos compostos encontrados no sangue também está presente na saliva em concentrações proporcionais (CURVELO et al, 2010). Dessa maneira, a saliva pode refletir a situação fisiológica do corpo (CURVELO et al, 2010), e fornecer uma fonte para o monitoramento da saúde bucal e sistêmica (SPIELMANN; WONG, 2011). Além disso, a coleta de saliva comparada ao exame de sangue ou urina é um procedimento de fácil aceitação, devido às suas características de ser não invasivo e facilmente reproduzível (SANTOS *et al*, 2007, AMADO, 2013). Devido ao fato, os métodos diagnósticos salivares têm sido desenvolvidos nas duas últimas décadas para monitorar, via oral, tanto doenças sistêmicas, incluindo as variações emocionais, endócrinas, nutricionais e metabólicas (SPIELMANN; WONG, 2011), como doenças orais, incluindo cárie e doença periodontal.

Dentre os muitos usos da saliva para diagnóstico, ela tem sido usada para medir os hormônios esteroidais, níveis de anticorpos, drogas, tanto as ilícitas quanto as prescritas, DNA e biomarcadores proteicos (XIAO; WONG, 2012, JONG et al, 2011). Os anticorpos contra o vírus e componentes virais podem também ser detectados na saliva, tornando mais fácil o diagnóstico de várias infecções, tais como, hepatite A, B, ou C, HIV (GENCO, 2014), rubéola e dengue. Mais recentemente, Moore (2014) concluiu que a saliva pode ser usada como biomarcador para detectar a exposição humana à radiação. Entretanto, para que a saliva se torne uma matriz de análise alternativa ao plasma, com semelhante grau de confiabilidade, é necessário o estabelecimento de uma correlação confirmada entre as concentrações dos compostos nos dois meios (CHIAPIN, 2007).

A saliva humana possui um amplo grupo de constituintes proteicos e não proteicos com imenso potencial informativo para a detecção de doenças sistêmicas. No entanto esse potencial só poderá ser traduzido em metodologias efetivas a partir do estabelecimento de um padrão referencial dos compostos salivares (XIE et al, 2005). A partir desse padrão referencial, a interpretação qualitativa e a quantitativa, dos componentes da saliva, poderá não só determinar o

diagnóstico, mas também avaliar o melhor tratamento para distúrbios sistêmicos (CURVELO et al. 2010). Contudo, muitas doenças sistêmicas, tais como câncer, gota, doenças reumáticas (BANSAL; VASHIST, 2012), alterações cardiovasculares e doenças neurológicas, são muito difíceis de diagnosticar sem avaliação clínica suplementar. Atualmente três grandes limitações impedem as pessoas de reconhecerem o potencial de detecção da doença, e, tem prejudicado seriamente o desenvolvimento de diagnósticos clínicos, que incluem as ausências de:

- 1) biomarcadores moleculares definitivos para doenças específicas;
- 2) método de amostragem fácil e barato, com o mínimo de desconforto;
- 3) plataforma precisa fácil de usar e portátil para facilitar a detecção da doença precocemente (LEE; WONG, 2009).

Desde 2002, o Instituto Nacional de Odontologia e Pesquisas Craniofaciais, nos Estados Unidos da América, vem criando oportunidades para superar essas limitações, explorando líquidos por via oral como uma ferramenta de diagnóstico para avaliação do estado de saúde e doença (LEE; WONG, 2009). Recentemente, vários relatórios com o objetivo de catalogar o proteoma salivar foram publicados, com o número de proteínas identificadas, variando de centenas a mais de mil (XIE et al., 2005). Essa percepção vai permitir aos cientistas, a ligação entre a investigação em saúde bucal com diagnóstico de doença sistêmica.

No entanto, a necessidade de preservar a estabilidade da saliva durante e / ou depois da coleta (THOMADAKI et al, 2011), tem sido considerado um fator que pode influenciar os resultados obtidos. O tratamento das amostras de saliva não é uma questão simples. Os principais desafios relacionados à preservação da saliva referem-se à complexidade da sua composição e da sua elevada atividade proteolítica inerente. (HELMERHORST; OPPENHEIM, 2007). Conseqüentemente, a coleta e o armazenamento da saliva exigem precauções especiais para preservação de seus componentes (CROUCH, 2005).

Vários fatores podem levar à danificação da saliva como amostra de análise, tal como a contaminação por sangue, que faria com que a quantidade estimada das moléculas presentes na saliva fosse comprometida com a presença de compostos essencialmente plasmáticos (CHIAPPIN et al, 2007). Dawes (1975) mostrou que o ritmo circadiano representa, também, um fator importante a ser

considerado. Por ser capaz de alterar o fluxo salivar em períodos específicos do dia, o valor das expressões dos compostos salivares poderia ser conseqüentemente, alterado. Estudos já demonstraram que a própria escovação dentária pode alterar a concentração de proteínas na saliva por um período específico de tempo, provavelmente através da contaminação do fluido por constituintes plasmáticos (HOEK et al, 2002).

Entre as razões mais importantes na padronização dos resultados está a temperatura versus tempo de conservação das amostras, já que níveis mais elevados de peptídeos são vistos com aumento da taxa de congelamento. Isso pode não ser surpreendente, pois existem estudos anteriores que sugerem diminuição na abundância da proteína salivar, quando deixada à temperatura ambiente por longos períodos de tempo (JONG et al, 2011). Xiao & Wong (2012) reconheceram que o conhecimento dos requisitos de manuseio da amostra é crucial para o uso de saliva em testes de diagnóstico. Uma causa importante parece ser a proteólise rápida dos membros proeminentes das famílias de proteínas salivares por proteases endógenas, por isso, inibidores de protease diferentes são normalmente adicionados durante a coleta das amostras. A estabilidade na amostra salivar já foi pesquisada em relação a esteroides, melatonina, imunoglobulinas salivares, e outras proteínas (JONG, 2011). Ao estudar um método simples e conveniente para a estabilização de proteínas em saliva humana, diferentes condições de temperatura e de PH também devem ser incluídas, uma vez que afetarão grande parte da proteólise. Logo, métodos simples de usar, confiáveis e práticos são urgentemente necessários para a estabilização do proteoma salivar durante o armazenamento da saliva humana, seja por meio da adição de inibidores de protease, adição de etanol ou a desnaturação e remoção da amilase (XIAO; WONG, 2012).

Na extensa utilização de saliva humana para aplicações clínicas, um grande desafio é estabilizar e manter a integridade do proteoma salivar para o diagnóstico (XIAO; WONG, 2012). Priorizando estas condições, alguns autores já direcionaram seus estudos para encontrar uma padronização na forma de coleta e manipulação da saliva, que possa garantir a manutenção do proteoma salivar para análise. Nesse contexto, Jong et al, (2011), apresentaram trabalho avaliando as implicações resultantes de variados graus de congelamento, graus de nutrição e temperatura ambiente nos níveis de abundância nos peptídios salivares, e suas

implicações na descoberta de biomarcadores. Em estudos para detectar o transcriptoma salivar, Lee et al. (2011) substituiu a técnica de isolamento do mRNA (RNA mensageiro) - pelo método de DSTA (direct saliva transcriptone analysis – análise transcriptômica direta da saliva), utilizando o sobrenadante livre de células. Todos os procedimentos, incluindo processamento, estabilização e conservação foram realizados em temperatura ambiente e sem adição de inibidores. O estudo de Liu et al (2010) objetivou determinar se a adição de inibidores de protease poderia afetar, tanto qualitativamente quanto quantitativamente, os resultados dos perfis microbiológicos. Com o propósito de padronizar a manipulação das amostras de saliva nos estudos proteômicos, Chevalier et al (2007) propuseram a avaliação do melhor protocolo para estabilizar a saliva, utilizando a estocagem variando de -80 até 20⁰C através das análises por eletroforese uni e bi-dimencional. As concentrações das imunoglobulinas, tipo IgA1 e PsaA foram avaliadas por Nurkka et al (2003), utilizando quatro diferentes métodos de coleta e três diferentes formas de estocagem. Esser et al (2008) em um estudo com sete voluntários, avaliou a estabilidade e a composição proteica da saliva em temperatura ambiente e Xiao and Wong (2012), com dez voluntários, estudou em temperatura ambiente e 4⁰C, por diferentes espaços de tempo, com e sem tratamento com estabilizantes específicos de proteína.

Dessa forma, considerando ser de grande relevância o adequado armazenamento da saliva para uma correta análise laboratorial, o propósito do presente estudo foi avaliar se diferentes protocolos de tratamento da saliva podem alterar sua composição proteica.

2. HIPÓTESES

2.1. Hipótese Nula (H_0): Estabelece não haver alterações nas concentrações de proteínas totais salivares diante das variações metodológicas ora propostas envolvendo momento da centrifugação, temperatura de armazenamento das amostras, e uso de inibidores de proteases em momentos diversos.

2.2. Hipótese Alternativa (H_1): Estabelece haver alterações nas concentrações de proteínas totais salivares diante das variações metodológicas ora propostas envolvendo momento da centrifugação, temperatura de armazenamento das amostras, e uso de inibidores de proteases em momentos diversos.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar a concentração de proteínas totais, em saliva total humana frente a diferentes protocolos de tratamento da saliva.

3.2. Objetivos específicos

- Determinar os perfis de proteínas totais de amostras de saliva centrifugadas logo após a sua coleta, e que receberam adição de inibidor de proteases;
- Determinar os perfis de proteínas totais de amostras de saliva centrifugadas logo após a sua coleta, e que não receberam adição de inibidor de proteases;
- Determinar os perfis de proteínas totais de amostras de saliva centrifugadas logo após a sua coleta, que não receberam adição de inibidor de proteases e permaneceram 24 horas em temperatura ambiente;
- Determinar os perfis de proteínas totais de amostras de saliva centrifugadas após 30 dias de sua coleta, e que não receberam adição de inibidor de proteases;
- Determinar os perfis de proteínas totais de amostras de saliva centrifugadas após 30 dias de sua coleta, e que receberam adição de inibidor de proteases;
- Comparar, entre si, os perfis de proteínas totais de amostras de saliva submetidas a diferentes protocolos de centrifugação, ao uso de inibidor de proteases e temperatura ambiente.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Considerações éticas

O presente estudo foi enviado ao Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos da Universidade Federal do Ceará para apreciação antes de sua execução. Após aprovação pelo Comitê de Ética, tendo sido aprovado pelo Parecer de número 1.225.703, em 08/06/2015, foi entregue aos voluntários do estudo um “Termo de Consentimento Livre e Esclarecido” (Apêndice A), no qual foram serão explicados os objetivos, metodologia, bem como riscos e benefícios relacionados de acordo com as Diretrizes e Normas Regulamentadoras do Conselho Nacional de Saúde (Resolução nº 466/2012).

4.2. Desenho do estudo

A presente pesquisa consistiu de um estudo experimental e analítico.

4.3. Amostra

A amostra foi composta por dez voluntários, seis do sexo feminino e quatro do sexo masculino, com idades entre 23 a 65 anos, residentes na cidade de Fortaleza-CE. Os referidos voluntários foram recrutados no período de maio / 2015 (Quadro 1).

Quadro 1: Distriuição dos pacientes segundo idade e sexo

Voluntário	Idade	Sexo
A	29 a	Fem
B	24 a	Fem
C	31 a	Fem
D	26 a	Masc
E	25 a	Fem
F	39 a	Masc
G	23 a	Fem
H	65 a	Fem
I	24 a	Masc
J	24 a	Masc

4.4. Critérios de inclusão

- Ambos os sexos, com idade de 23 a 65 anos.
- Ausência de doenças sistêmicas e/ou pacientes sob o uso de quaisquer medicamentos que possam alterar o fluxo e/ou a composição salivar (exemplos: antidepressivos tricíclicos, anti-histamínicos, antieméticos, bronco dilatadores);
- Apresentar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido devidamente assinado.

4.5. Critérios de exclusão

- Procedimento cirúrgico no complexo crânio facial, que tenham alguma interferência sobre o fluxo salivar.
- Lesões ulcerativas na cavidade bucal.

4.6. Critério de retirada

- Os indivíduos serão removidos da pesquisa, caso não compareçam na data e hora marcadas para a coleta.

4.7. Examinadores

O estudo, incluindo os protocolos clínico e analítico, foi conduzido pela pesquisadora principal, estudante de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Ceará. No protocolo analítico, a pesquisadora teve o auxílio de dois estudantes de graduação, bolsistas do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica-PIBIC. Todos os examinadores foram adequadamente padronizados quanto à metodologia para o presente estudo

4.8. Protocolo clínico

4.8.1. Anamnese

Os voluntários foram submetidos a uma anamnese, em que se obteve informações concernentes ao seu estado geral de saúde. Nesse momento, foram avaliados parâmetros de saúde geral que pudessem, de alguma forma, influenciar o padrão salivar do voluntário (Apêndice B).

4.8.2. Coleta de saliva

A coleta de saliva foi realizada na Clínica Integrada do Curso de Odontologia da Universidade Federal do Ceará. Uma amostra de saliva total não estimulada foi coletada de cada participante entre 9 e 10h da manhã, para reduzir possíveis contribuições circadianas, após um mínimo de uma hora de jejum. Foi requerido, aos voluntários, que os procedimentos rotineiros de higienização da cavidade oral fossem realizados uma hora antes da coleta. Os voluntários ficaram em repouso durante trinta minutos. Logo após a saliva foi coletada, em copo plástico milimetrado, por meio de escoamento através do lábio inferior, estando o voluntário com a cabeça levemente inclinada para frente. O armazenamento da saliva coletada de cada voluntário ocorreu em seis tubos Eppendorfs® (cada tubo com 0,5mL de saliva) e essas amostras foram tratadas de acordo com os referidos grupos experimentais:

Tabela 1: Grupos experimentais segundo os diferentes protocolos de tratamento das amostras de saliva.

Grupos	Centrifugação (1200 G, 4 ^o C, 10 minutos)	Inibidor enzimático	Temperatura
G1	Logo após a coleta	Ausente	Ambiente por 24 h seguida por -80 ^o C por 29 dias
G2	Logo após a coleta	Ausente	-80 ^o C por 30 dias
G3	Logo após a coleta	Presente no ato da coleta	-80 ^o C por 30 dias
G4	Logo após a coleta	Ausente no ato da coleta e presente no momento da análise	-80 ^o C por 30 dias
G5	30 dias após a coleta	Ausente	-80 ^o C por 30 dias
G6	30 dias após a coleta	Ausente no ato da coleta e presente no momento da análise	-80 ^o C por 30 dias

Fonte: Elaborado pela autora

Foi utilizado durante o processo, numa proporção de 5 μ l (microlitros) por ml (mililitro), o seguinte Inibidor: Protease Inhibitor Cocktail, (Sigma Aldrich, Saint Louis, Mo, USA)

4.9. Protocolo analítico

4.9.1. Mensuração do fluxo salivar

A determinação do fluxo salivar foi realizada após a coleta de saliva, e foi observado e registrado em mL o volume total de saliva durante dez minutos, tendo sido descartados qualquer espuma e debrís. O fluxo salivar foi determinado pelo volume de saliva depositado no copo milimetrado, dividido pelo tempo de coleta de dez minutos.

4.9.2. Dosagem de proteínas totais salivares pelo método do ácido bicinonínico (BCA)

A concentração de proteínas totais salivares das alíquotas de saliva foi determinada pelo método do Acido bicinonínico (BCA), utilizando como padrão uma curva de albumina sérica bovina (BSA). Foram seguidas as recomendações do fabricante, sendo a solução homogeneizada e lida a uma absorbância de 562nm através de espectrofotômetro, leitor de microplaca (Biotec Epoch USA) Os resultados foram calculados baseando-se na curva padrão de BSA.

4.10. Análise estatística

Os dados, após coletados, foram tabulados em tabela do software Microsoft Excel® versão 2010, submetidos à análise estatística, sendo utilizado para este fim o software IBM Statistical Package for the Social Science (SPSS) versão 20.0 para Mac OS X. Foram reportadas as estatísticas descritivas (média, mediana e desvio padrão) e frequência dos dados. Para a verificação da existência de normalidade dos dados, foi utilizado o teste Shapiro-Wilk.. A presença de possíveis correlações entre as variáveis do estudo foi avaliada mediante os testes de correlação de Pearson e Spearman. A comparação entre os dados foi feita mediante o teste ANOVA para medidas repetidas. O nível de significância estatística adotado para todos os testes foi de 5% ($p < 0,05$).

5. RESULTADOS

A estatística descritiva das variáveis estudadas no presente trabalho encontra-se descrita na Tabela 2.

Tabela 2. Estatística básica dos dados da pesquisa referente a dez voluntários sadios.

Variáveis		Média ±	Mediana	Percentis	
		Desvio Padrão da Média	(Min-Max)	25%	75%
Idade- anos		31,10±4,059	25,50 (23-65)	24,00	33,00
Fluxo- ml/min		0,4340± 0,13199	0,2500 (0,07-1.2)	0,1150	0,8000
Proteínas Totais mg	G1	1,2107±0,25096	0,9510 (0,38-2,64)	0,4845	1,9821
	G2	1,2012±0,23042	1,1073 (0,27-2,28)	0,5265	1,8968
	G3	1,4545±0,24259	1,1483 (0,66-2,66)	0,7683	2,2789
	G4	1,0994±0,13301	1,0105 (0,60-1,94)	0,7310	1,4556
	G5	1,3096±0,22296	1,0188 (0,59-2,30)	0,6585	2,0151
	G6	1,3548±0,30650	1,0458 (0,34-3,66)	0,6581	1,7946
Proteínas Normalizadas* mg/mim	G1	0,3120±0,04912	0,2750 (0,14-0,60)	0,1725	0,4450
	G2	0,3660±0,08168	0,3550 (0,09-0,84)	0,1200	0,5725
	G3	0,4920±0,13552	0,2400 (0,16-1,46)	0,1850	0,7700
	G4	0,3690±0,08428	0,3150 (0,11-0,88)	0,1725	0,5125
	G5	0,4010±0,08916	0,2700 (0,13-0,98)	0,1800	0,6475
	G6	0,3950±0,09922	0,2800 (0,12-1,12)	0,1900	0,5250

Fonte: Elaborado pela autora

* Valores de proteínas totais normalizadas com base no fluxo salivar (mg/min)

5.1. Avaliação da normalidade dos dados

Os resultados dos testes de normalidade demonstraram que, com exceção das variáveis idade ($P= 0,000$) fluxo salivar ($P= 0,012$), 1ª amostra da duplicata de proteínas totais médias em G 5 ($P=0,014$), concentrações de proteínas totais em G 5 ($P= 0,045$) e G 6 ($P= 0,048$), todas as demais variáveis apresentaram distribuição normal (Tabela 3).

Tabela 3. Teste de Shapiro-Wilk para avaliação da distribuição dos dados.

Variáveis	Shapiro-Wilk		
	Estatística	Grau de Liberdade	P-valor
Idade	0,651	10	0,000*
FluxoSalivar	0,793	10	0,012*
G1 ProteínasTotais_1a	0,859	10	0,074
G1 ProteínasTotais_2a	0,878	10	0,123
G1 ProteínasTotais_Média	0,899	10	0,215
G1 Proteínas Normalizadas	0,904	10	0,245
G2 ProteínasTotais_1a	0,940	10	0,557
G2 ProteínasTotais_2a	0,874	10	0,112
G2 ProteínasTotais_Média	0,888	10	0,159
G2 Proteínas Normalizadas	0,884	10	0,146
G3 ProteínasTotais_1a	0,851	10	0,060
G3 ProteínasTotais_2a	0,919	10	0,350
G3 ProteínasTotais_Média	0,865	10	0,087
G3 Proteínas Normalizadas	0,784	10	0,009
G4 ProteínasTotais_1a	0,967	10	0,864
G4 ProteínasTotais_2a	0,927	10	0,422
G4 ProteínasTotais_Média	0,931	10	0,457
G4 Proteínas Normalizadas	0,840	10	0,044
G5 ProteínasTotais_1a	0,799	10	0,014*
G5 ProteínasTotais_2a	0,966	10	0,850
G5 ProteínasTotais_Média	0,841	10	0,045*
G5 Proteínas Normalizadas	0,863	10	0,083
G6 ProteínasTotais_1a	0,860	10	0,077
G6 ProteínasTotais_2a	0,847	10	0,054
G6 ProteínasTotais_Média	0,843	10	0,048*
G6 Proteínas Normalizadas	.808	10	0,018

* $p < 0,05$

Fonte: Elaborado pela autora

5.2. Avaliação das correlações entre os grupos

Observou-se uma correlação positiva muito forte entre as duplicatas (1ª e 2ª amostras analisadas) das análises de concentração proteica dos grupos G1 ($r = 0,845$; $p = 0,02$), G2 ($r = 0,769$; $p = 0,009$), G3 ($r = 0,774$; $p = 0,009$), G4 ($r = 0,113$), G5 ($r = 0,836$; $p = 0,003$) e G6 ($r = 0,980$; $p = 0,000$).

As concentrações médias de proteínas totais demonstraram uma correlação negativa muito forte com o fluxo salivar em G1 ($r = -0,0794$; $p = 0,020$), e uma forte correlação nos grupos G4 ($r = -0,690$; $p = 0,027$) e G5 ($r = -0,626$; $p = 0,05$). Em contrapartida, essas correlações não foram observadas em G2 ($r = -0,568$; $p = 0,087$), G3 ($r = -0,476$; $p = 0,164$), e G6 ($r = -0,528$, $p = 0,117$). Uma correlação entre proteínas totais e idade só foi observada no grupo G3 ($\rho = 0,762$; $p = 0,01$).

5.3. Comparação entre os grupos

O uso de diferentes tratamentos na saliva, não gerou alterações estatisticamente significantes nas concentrações de proteínas totais médias, $F(5,45) = 1,132$, $p = 0,358$. Esses resultados foram, também, observados ao se comparar as médias de proteínas totais com base no fluxo salivar dos voluntários, $F(5,45) = 2,068$, $p = 0,087$. (Tabelas 4 e 5; Figuras 1 e 2)

Tabela 4. Comparação entre os diferentes grupos de tratamento da saliva com relação a variável concentração total média de proteínas, através do teste ANOVA para medidas repetidas ($p < 0,05$)

Variável		Somatório de Medidas Tipo III	Grau de Liberdade	Média	F	p.Valor	Proporção de Diferença de Variância
Grupos de Tratamento Saliva	Sphericity Assumed	0,801	5	0,160	1,132	0,358	112
	Greenhouse-Geisser	0,801	3,009	0,266	1,132	0,354	112
	Huynh-Feldt	0,801	4,689	0,171	1,132	0,358	112
	Lower-bound	0,801	1,000	0,801	1,132	0,315	112
Error (Grupos de Tratamento Saliva)	Sphericity Assumed	6,372	45	0,142			
	Greenhouse-Geisser	6,372	27,082	0,235			
	Huynh-Feldt	6,372	42,202	0,151			

Fonte: Elaborado pela autora

Tabela 5 - Comparação entre os diferentes grupos de tratamento da saliva com relação à variável concentração total de proteínas ajustadas com base no fluxo salivar, através do teste ANOVA para medidas repetidas ($P < 0,05$).

Variável		Somatório de Medidas Tipo III	Grau de Liberdade	Média	F	p.Valor	Proporção de Diferença de Variância
Grupos Tratamento Saliva	Sphericity Assumed	0,176	5	0,035	2,068	0,087	187
	Greenhouse-Geisser	0,176	2,495	0,071	2,068	0,141	187
	Huynh-Feldt	0,176	3,528	0,050	2,068	0,116	187
	Lower-bound	0,176	1,000	0,176	2,068	0,184	187
Error (Grupos Tratamento Saliva)	Sphericity Assumed	0,768	45	0,017			
	Greenhouse-Geisser	0,768	22,457	0,034			
	Huynh-Feldt	0,768	31,756	0,024			
	Lower-bound	0,768	9,000	0,085			

Fonte: Elaborado pela autora

Figura 1. Médias marginais estimadas de proteínas totais para os diferentes grupos de tratamento da saliva.

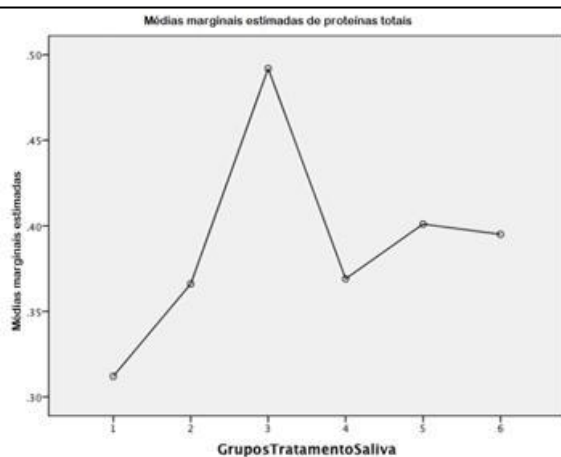
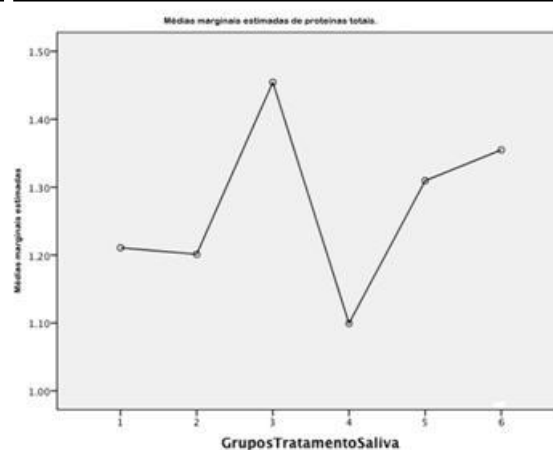


Figura 2. Médias marginais estimadas de proteínas totais ajustadas com base no fluxo salivar para os diferentes grupos de tratamento da saliva.



Fonte: Elaborado pela autora

6. DISCUSSÃO

O uso da saliva como meio para diagnóstico exige um grande controle na manipulação e armazenamento das amostras. O uso de centrifugação, e inibidores de proteases prepara a saliva para permanecer estável. Neste trabalho avaliamos se existe alteração na concentração das proteínas salivares, na presença de variáveis como centrifugação das amostras em etapas distintas, temperatura durante o armazenamento e a utilização de um coquetel de inibidores de protease, também em momentos diferentes.

A correlação positiva entre as duplicatas (1^a e 2^a amostras avaliadas) das análises da maioria dos grupos, obtidas neste trabalho, confirma a hipótese de que a concentração das proteínas não foi alterada nas variáveis, temperatura, centrifugação e adição de inibidor de protease, estudadas, não apresentando correlação estatisticamente significativa, salvo em G4 (centrifugadas logo após a coleta, que somente recebeu inibidor enzimático no ato da análise e foram conservadas a -80^o C por 30 dias), no qual se observou correlação entre suas medidas. A ausência de alterações na concentração de proteínas resultante neste trabalho não condiz com o que encontrou Esser (2008), que examinou amostras de saliva total fresca após incubação da mesma, com e sem inibidores de proteases e metabolismo bacteriano, através da análise SELDI, e demonstraram haver degradação das proteínas salivares com trinta minutos após a coleta da saliva. Na realidade, o autor informou iniciar o processo de degradação das proteínas durante a coleta das amostras de saliva. Entretanto, Liu et al (2010) observaram não haver diferenças, estatisticamente significantes quando na adição de inibidores de protease se poderiam afetar os resultados quantitativos e qualitativos, do perfil microbiano na saliva de vinte e dois doadores, processada imediatamente após a coleta.

Resultados observados, neste presente trabalho, demonstraram não haver diferenças significativas nos níveis de proteínas totais por efeito da variante temperatura, não coincidindo com Xiao & Wong (2012) que observaram diferença significativa na expressão de proteínas salivares, na presença de temperatura de armazenamento de -80^o C e temperatura ambiente, quando na ausência do uso de inibidor ($p = 0,024$, $n = 4$). Entretanto, quando as amostras de saliva foram armazenadas a temperatura ambiente com adição de etanol a 20%, não houve

diferença estatisticamente significativa. Jong et al, (2011) estudando a concentração de peptídeos na saliva, avaliou os efeitos do grau de congelamento das amostras, o estado nutricional do doador (alimentado VS jejum) e degradação do nível de abundância de peptídeos em temperatura ambiente. A manutenção em temperatura ambiente (20° C) mostrou influência estatisticamente insignificante nos primeiros 15 minutos, entretanto, após 24h, mostrou uma queda estatisticamente significativa na concentração de peptídeos. Chevalier et al. (2007), ao analisar amostras de saliva estimulada por meio de eletroforese, uni e bi dimensional, após armazenamento das amostras de saliva em três diferentes temperaturas (-20° C, 4° C, e 20° C), com variantes de centrifugação e adição de inibidor de protease, demonstrou não haver alteração na concentração de proteínas salivares quando as amostras foram mantidas em temperatura ambiente por até 24h. Contudo, entre 7 e 30 dias houve uma redução da banda alfa-amilase. A variável concentração média, de proteínas totais, demonstrou neste estudo uma correlação negativa muito forte com o fluxo salivar em G1 (Centrifugados após a coleta, não recebeu inibidor enzimático, mantida 24h em temperatura ambiente e depois conservada a -80° C por 29 dias) e uma forte correlação nos grupos G4 (centrifugadas logo após a coleta, somente recebeu inibidor enzimático no ato da análise e foram conservadas a -80° C por 30 dias) e G5 (centrifugadas após 30 dias, mantidas a -80° C e não recebeu inibidor), não sendo observada correlação entre os grupos G2 (centrifugadas após a coleta, não receberam inibidor enzimático e mantidas a -80° C por trinta dias) G3 (centrifugadas após a coleta e receberam inibidor enzimático, sendo mantidas a -80° C por 30 dias) e G6 (centrifugadas após 30 dias e receberam inibidor no ato da análise, mantidas a -80° C). Walsh et al (2004), encontraram uma redução no fluxo salivar e um aumento na concentração das proteínas totais, num estudo que avalia a concentração das proteínas e fluxo salivar na presença de desidratação. López et al (2003), para determinar características físicas e bioquímicas da saliva de um grupo de crianças diabéticas, mostraram, também, uma inversão nos parâmetros de proteínas totais quando relacionadas com o fluxo salivar. Panchbhai et al, (2010) encontrou resultados que coincidentes, estudando diferentes grupos de diabéticos, controlados e não controlados na Índia, que observaram uma significativa correlação negativa nos níveis de proteínas totais e fluxo salivar de ambos os grupos .

Nesta pesquisa, apenas as amostras do G3, (centrifugadas logo após a coleta, que receberam inibidor imediatamente e foram armazenadas à temperatura

de -80°C por 30 dias), demonstraram correlação estatisticamente significativa entre proteínas totais e idade. Bales et al (1990) avaliaram as concentrações normais de oligoelementos e proteínas totais na saliva da parótida (sobrenadante) e saliva total, plasma e cabelo em 278 adultos saudáveis: jovens (18-29 a), meia idade (30-64 a) e idosos (65-93 a), onde a média dos valores de proteínas totais foram superiores para o grupo de idosos, tanto no sobrenadante da saliva da parótida, quanto saliva total, mostrando uma correlação positiva com o aumento da idade. Bem-Aryeh et al (1986), estudando a concentração das proteínas salivares em dois grupos de voluntários: jovens (37 ± 10.5 anos) e velhos (66 ± 3.3 anos), para avaliar o efeito da idade nas glândulas salivares, comparou saliva total estimulada, saliva total em repouso e saliva da parótida, e, observou haver uma diminuição do fluxo salivar com o aumento da idade, e não apresentou diferenças estatisticamente significantes na concentração das proteínas totais de nenhum tipo de saliva.

Os resultados da presente pesquisa levam a concluir que os diferentes protocolos de tratamento dado à saliva após sua coleta não alteram quantitativamente as proteínas totais salivares, seja pela alteração no momento da centrifugação das amostras, a utilização ou não de inibidores de proteases, aliados a manutenção dessas amostras em temperatura ambiente por 24 horas. Esses resultados não excluem a possibilidade de alterações qualitativas na expressão de proteínas e peptídeos devido à possibilidade de desnaturação dos mesmos, sendo necessários estudos mais detalhados para investigação dos parâmetros qualitativos de saliva total humana.

Um grande passo foi dado na direção de facilitar o armazenamento da saliva após a sua coleta. O resultado desta pesquisa mostrou que o fato de centrifugar ou não centrifugar a saliva num prazo de até 30 dias, que a permanência das amostras em temperatura ambiente por 24h e que a adição de inibidores de proteases antes ou após 30 dias, no momento da análise, não interfere no perfil de proteínas totais, facilitando a utilização da saliva como meio de análise alternativo. A liberdade de poder contar com 24h para o deslocamento das amostras, de não necessitar de centrífuga no local da coleta e não exigir a adição imediata de compostos de alto valor aquisitivo, pode favorecer as pesquisas em saúde pública, somando mais uma vantagem aos contextos de fácil coleta, menor ônus, e capacidade de diagnóstico e monitoramento de alterações sistêmicas.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- A concentração de proteínas totais tende a diminuir com o aumento no fluxo salivar;
- O perfil de proteínas totais de amostras de saliva centrifugadas logo após a sua coleta, e que receberam adição de inibidor de proteases é semelhante ao observado nas amostras de saliva centrifugadas logo após a sua coleta, e que não receberam adição de inibidor de proteases;
- O perfil de proteínas totais de amostras de saliva centrifugadas logo após a sua coleta, que não receberam adição de inibidor de proteases e permaneceram 24 horas em temperatura ambiente não se diferenciou do perfil proteico salivar de amostras tratadas de forma semelhante quanto a centrifugação e adição de inibidor;
- A centrifugação das amostras de saliva 30 dias após a coleta, não alterou o perfil de proteínas totais dessas amostras;
- O perfil de proteínas totais de amostras que ficaram 24 horas em temperatura ambiente e depois foram mantidas a -80°C não se diferenciou do perfil proteico salivar de amostras que foram mantidas a -80°C por 30 dias.

REFERÊNCIAS

- AMADO. F. M. L.; FERREIRA. R. P.; VITORINO. R. One decade of salivary proteomics: Current approaches and outstanding challenges. **Clinical Biochemistry.**, n. 46: p. 506–517, 2013.
- BALES. C. W.; FREELAND-GRAVES. J. H.; ASKEY. S.; BEHMARDI. F.; POBOCIL. R. S.; FICKEL. J. J.; GREENLEE. P. Zinc, magnesium, copper, and protein concentrations in human saliva: age- and sex-related differences. **Am J Clin Nutr.**, v. 51, p. 462-9, 1990.
- BANSAL. M. and VASHIST. S. Saliva-a diagnostic tool. **Indian J Dent Adv.**, v. 4, n. 3, p. 910-916, 2012.
- BEN-ARYEH. H.; SHALEV. A.; SZARGEL. R.; LAOR. A.; LAUFER. D.; GUTMAN. D. The Salivary Flow Rate and Composition of Whole and Parotid Resting and Stimulated Saliva in Young and Old Healthy Subjects. **Biochemical Medicine and Metabolic Biology.**; n. 36: p. 260-265, 1986.
- CHIAPPIN S, ANTONELLI G, GATTI R, DE PALO EF. Saliva specimen: A new laboratory tool for diagnostic and basic investigation. **Clinica Chimica Acta.**, n. 383: p. 30–40. 2007.
- CHEVALIER. F.; HIRTZ. C.; CHAY. S.; CUISINIER. F.; SOMMERER. N.; RISSIGNAL. M.; PEÉRIÈRE. D.D. Proteomic studies of saliva: A Proposal for Standardized Handling of Clinical Samples.; **Clin. Proteom** n.3: p.13-21, 2007.
- CROUCH. D. J. Oral fluid collection. The neglected variable in oral fluid testing. **Forensic Science International**; n.150: p.165–173, 2005
- CURVELO. J. A. R.; FERREIRA. D.C.; GONÇALVES. E. A. S.; BERTOLINI. M. M.; FERNANDES. L. B. F. Análise da saliva nas desordens sistêmicas. **Revista de Odontologia da Universidade Cidade de São Paulo**; v.22, n.2, p. 163-73, 2010.
- DAWES. C. Circadian rhythms in the flow rate and composition of unstimulated and stimulated Human submandibular saliva. **J. Physiol.**, n.24:, p. 535-548, 1975.
- ESSER. G.; ALVAREZ-LLAMAS. G.; VRIES. M. P.; WEENING. D.; ROELOFSEN. V. H.; VRIES. M. P.; WEENING. D.; ROELOFSEN. R. L .V. and ROELOFSEN. H. Sample Stability and Protein Composition of Saliva. **Biomarker Insights.**,n. 3, p. 25–37, 2008.

GENCO. R. J. Salivary diagnostic tests., Disponível em:
http://jada.ada.org/content/143/suppl_10/3S Acesso em: 21 de agosto de 2014.

HELMERHORST. E. J. and OPPENHEIM. F. G. Saliva: a Dynamic Proteome. **J. Dent. Res.**, Disponível em:<http://jdr.sagepub.com/content/86/8/680> .Acesso em: 2 de junho de 2014.

HOEK. G. H.; BRAND. H. S.; VEERMAN. E. C. I. and NIEUW AMERONGEN. A. V. Toothbrushing affects the protein composition of whole saliva. **European Journal of Oral Science**; V. 110, n. 6, p. 480–481. 2002

JONG. E. P.; VAN RIPER. S. K.; KOOPMEINERS. J. S.; CARLIS. J. V.; TIMOTHY. J.; GRIFFIN. T. J. Sample collection and handling considerations for peptidomic studies in whole saliva; implications for biomarker discovery-**Clinica Chimica Acta**; n. 412, p. 2284–2288, 2011.

LEE. Y-H. Saliva: An emerging biofluid for early detection of diseases. *Am J Dent*; v. 22, n.4, p. 241–248, 2009.

LI. G.; CHEN. Z.; ABRAMS. W. R.; MALAMUD. D.; LI. Y.; **FEMS Microbial Lett.**; v.312, n.1, p. 63-70, 2010.

LIU G.; SAXENA D.; DENG H.; NORMAN R. G.; CHEN. Z.; ABRAMS. W. R.; MALAMUD. D.; LI. Y. Effect of protease inhibitors on the quantitative and qualitative assessment of oral microbes. **FEMS Microbiol Lett.**, v. 312,n.1, p. 63-70, 2010.

LÓPEZ. M. E.; COLLOCA. M. E.; PÁEZ. R. G.; SCHALLMACH. J. N.; KOSS. M. A.; CHERVONAGURA. A. Salivary Characteristics of Diabetic Children. **Braz Dent J.**, v.14, n.1, p. 26-31, 2003.

MOORE. H. D.; IVEY. R. G.; VOYTOVICH. J.; LIN. C.; STIREWALT. D. L.; POGOSOVA-AGADJANYAN. E.L.; PAULOVICH. A.G.
Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1667/RR13586.1> 2014 Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, Washington 98109-1024

NURKKA. A.; OBIERO. J.; KAYHTY. H.; SCOTT. J. A. G. Effects of Sample Collection and Storage Methods on Antipneumococcal Immunoglobulin A in Saliva **Clinical and diagnostic laboratory immunology.**, v. 10, n. 3, p. 357–361, 2003.

PANCHBHAI. A. S.; DEGWEKAR. S. S.; BHOWTE. R. R. Estimation of salivary

glucose, salivary amylase, salivary total protein and salivary flow rate in diabetics in India. **Journal of Oral Science.**, v. 52, n. 3, p. 359-368, 2010.

SANTOS. P. P. A.; IGLESIAS. D. P. P.; SOUZA. E. L.; FREITAS. R. A. - Saliva: Métodos Atuais para Coleta e Obtenção da Amostra. **Rev. Fac. Odontol. Porto Alegre**, Porto Alegre., v. 48, n. 1/3, p. 95-98, 2007.

SPIELMANN. N. and WONG. D. T.. Saliva diagnostics and therapeutic perspectives. **Oral Dis.**, v. 17, n. 4, p. 345–354, 2011.

THOMADAK. H. and HELMERHORST. E J.; TIAN. N.; SUN. X.; SIQUEIRA. W. L.; WALT. D. R.; AND OPPENHEIM. F. G.- Whole-saliva Proteolysis and Its Impact on Salivary Diagnostics. **J Res.**, v. 90, n. 11, p. 1325–1330, 2011.

WALSH. N. P.; MONTAGNE. J. C.; CALLOW. N.; ROWLANDS. A. V. **Arquives of Oral Biology.**, v. 49, p. 149-154, 2004.

XIAO. H.; WONG. D. T. Method development for proteome stabilization in human saliva. **Analytica Chimica Acta.**, v.22, p. 63– 69, 2012.

XIE. H.; NELSON. L.; RHODUS. N. L.; GRIFFIN. R. J.; CARLIS. J. V. AND GRIFFIN. T. J. A **Catalogue of Human Saliva Proteins Identified by Free Flow Electrophoresis-based Peptide Separation and Tandem Mass Spectrometry.** Disponível em: <<http://www.mcponline.org/content/41/1/1826.long>>. Acesso em: 21 ago. 2014.

APÊNDICE A

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PESQUISA

Você está sendo convidado a participar de um projeto de pesquisa intitulado “AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO PROTEICA SALIVAR FRENTE A DIFERENTES PROTOCOLOS DE TRATAMENTO DA SALIVA” sob a orientação da Prof^a Dr^a Cristiane Sá Roriz Fonteles. Sua participação é importante, porém, não deve participar 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 e idade, você estará declarando que por meio de livre e espontânea vontade, estará participando como voluntário do projeto de pesquisa citado acima, de responsabilidade da pesquisadora Iêda Maria Rocha Lima Vieira da Fonseca, aluna do mestrado do Programa de Pós-Graduação do Curso de Odontologia, da Universidade Federal do Ceará. O abaixo- assinado estará ciente que:

- a) Você deverá comparecer na Clínica Integrada, da Faculdade de Odontologia da UFC, em jejum de 2h e higienizar a boca 1h antes.
- b) Durante o estudo você deverá fornecer informação sobre o estado geral de saúde.
- c) Não haverá dor.
- d) A pesquisa NÃO TRARÁ PREJUÍZO a você.
- e) NÃO CORRE NENHUM TIPO DE RISCO ao participar desta pesquisa
- f) Apenas deverá colher saliva passivamente em um copo milimetrado.
- g) Você tem a liberdade de desistir ou interromper sua participação neste estudo no momento que desejar, sem necessidade de qualquer explicação.
- h) Sua identidade será mantida em sigilo. Os responsáveis pela pesquisa não o identificarão por ocasião da exposição e/ou publicação dos resultados obtidos.
- i) É condição indispensável para participação no estudo, que você não tenha doença sistêmica, nem fazer uso de medicação que possa alterar o fluxo

e/ou a composição salivar, tais como: antidepressivos tricíclicos, anti-histamínicos, antieméticos, bronco-dilatadores).

j) O surgimento de resfriados ou viroses, com conseqüente uso de medicações por período de tempo limitado, não exclui você do estudo.

l) Caso venham a surgir dúvidas ou perguntas, sinta-se livre para contatar a Dra. Iêda (responsável pelo projeto) na Faculdade de Odontologia (sala 1), ou no telefone 3366-8408 ou entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará-CEP/UFC, Rua Coronel Nunes de Melo, 1000, pelo telefone: 33668344.

CONSENTIMENTO DE PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO SUJEITO

Eu, _____, de

Fortaleza-CE., _____ de _____ de 2015

Assinatura

Assinatura da pesquisadora

APÊNDICE B

1. IDENTIFICAÇÃO

Nome: _____

Endereço: _____

_____ Telefone: _____

Cor: _____

Sexo: _____

Data do exame: ___/___/___

2. DADOS PESSOAIS

Local de Nascimento:

Cidade: _____ Estado: _____

Pais: _____

Data do nascimento:

Dia/ mês/ano ___/___/___ Idade atual (meses) _____

3. CONDIÇÕES DE SAÚDE

Alterações sistêmicas prévias? _____

Quais? _____

Alterações sistêmicas atuais? _____

Quais? _____

Quando foi diagnosticado? _____

Toma medicação para essa doença? _____

Quais? _____

Já fez algum procedimento cirúrgico? _____

Identifique: _____

Teve alguma internação nos últimos 5 anos? _____

Por quanto tempo? _____ Porque? _____

Assinatura