

FUMANTES PODEM APRESENTAR ALTERAÇÕES EM NÍVEIS DE PROTEÍNAS NA SALIVA

SMOKING MAY MAKE CHANGES IN LEVELS OF PROTEINS IN SALIVA

1- Ligia Terezani; 2- Renata Dellalibera-Joviliano.

1-Biomédica, Laboratório de Análises Clínicas da Santa Casa de Araraquara, *lcrsaude@bol.com.br*; 2- Faculdades Integradas Fafibe, HCFMRP-USP, *redellajov@fafibe.br*

Abstract: Saliva is a watery fluid that contains various substances which include the proteins, glycoproteins (mucin), electrolytes (sodium, chlorine, potassium and bicarbonate) and to a lesser extent, RNAase, DNAase, lysozyme, lactoperoxidase, lipase, lingual, kallikrein and IgA. Knowing that nicotine stimulates the salivary secretion in the oral cavity, this study aims to assess the levels of total proteins in saliva of smokers, comparing the results with nonsmokers. In this study we selected 27 volunteers aged between 19-25 years of which were divided into three groups: (1) active smokers (less than 10 cigarettes / day), (2) active smokers (less than 10 cigarettes / days) and (3) nonsmokers, and these control subjects. Saliva samples were collected in appropriate containers, and centrifuged and stored in a freezer until the time of analysis. The measurements of total protein were performed by adding the samples of saliva-specific reagents (Folin reagent) was read after 2-4 spectrophotometer. Statistical analysis was performed using nonparametric tests. The levels of total proteins in saliva of smokers (Group 1: 22.6 mg / ml in the saliva and Group 2: 18.7 mg / mL saliva) showed significant increases compared to nonsmokers (median 15.5 mg / mL saliva). Nicotine also stimulates salivary secretion, causes changes in protein composition of saliva.

Key-words: saliva, protein, smoking, nicotine

Resumo: A saliva é um líquido aquoso que contém várias substâncias das quais destacam-se proteínas, glicoproteínas (mucina), eletrólitos (sódio, cloro, potássio e bicarbonato) e, em menor quantidade, RNAase, DNAase, lisozima, lactoperoxidase, lipase lingual, calicreína e IgA. Sabendo que a nicotina estimula a secreção salivar na cavidade oral, este trabalho tem por objetivo avaliar os níveis de proteínas totais na saliva de indivíduos fumantes, comparando os resultados com indivíduos não fumantes. Neste estudo selecionamos 27 voluntários com idades variando entre 19-25 anos dos quais foram divididos em três grupos: (1) indivíduos fumantes ativos (igual ou superior a 10 cigarros/dia), (2) indivíduos fumantes ativos (menos que 10 cigarros/dia) e (3) indivíduos não fumantes, sendo estes indivíduos controles. As amostras de saliva foram colhidas em recipientes apropriados, sendo centrifugadas e estocadas em freezer até o momento das análises. As dosagens das proteínas totais foram realizadas

adicionando-se nas amostras de saliva reativos específicos (reativo de Folin) sendo as leituras realizadas em espectrofotômetro 2-4. As análises estatísticas foram realizadas através de testes não paramétricos. Os níveis de proteínas totais na saliva dos indivíduos fumantes (Grupo 1: 22,6 mg/mL saliva e Grupo 2: 18,7 mg/mL saliva) apresentaram aumentos significantes em relação aos indivíduos não fumantes (mediana: 15,5 mg/mL saliva). A nicotina além de estimular a secreção salivar, provoca alteração na composição protéica da saliva.

Palavras-chave: saliva, proteína, fumante, nicotina

1-Introdução

1.1-A Saliva e Sua Função

A saliva é um fluido biológico, aquoso que contém várias substâncias, principalmente, proteínas e glicoproteínas. Entre as glicoproteínas destaca-se a mucina, considerada uma molécula de alto peso molecular que permite a saliva apresentar propriedades viscosas e mucinosa. A mucina produzida pela secreção mucosa, é responsável pela lubrificação e proteção das superfícies da cavidade oral. Além disso, existe também a secreção salivar serosa que é composta pela ptialina ou amilase salivar, que é uma enzima responsável pela digestão de amidos (reduz o amido a moléculas de oligossacarídeos). O pH ótimo da amilase salivar é de aproximadamente igual a 7,0 porém, ela torna-se ativa num pH de 4 e 11. A amilase salivar termina sua função no estômago onde o pH, devido ao ácido gástrico, reduz para 4,0 e a enzima passa a ficar inativa (BERNE, & LEVY, 2000; GUYTON, & HALL, 2002).

Em menor quantidade, outros componentes fazem parte da saliva, entre eles, RNAase, DNAase, lisozima, lactoperoxidase, lipase lingual, calicreína e imunoglobulina do tipo A secretória (DOUGLAS, 1999; HERNANDEZ, REIS & DONADI, 1998 [1]; HERNANDEZ, REIS & DONADI, 2002 [2]).

1.1.2 – Capacidade- Tampão da Saliva

A capacidade- tampão da saliva (CTS) é a propriedade de a saliva manter o seu pH constante a 6,9-7,0, graças aos seus tampões, mucinato/ mucina, $\text{HCO}_3^- / \text{H}_2\text{CO}_3$ e $\text{HPO}_4^{2-} / \text{H}_2\text{PO}_4^-$, que bloqueiam o excesso de ácidos e de bases.

Os tampões mucinato/ mucina e monofosfato/ bifosfato agem da mesma forma e, assim, o elevado poder tamponante da saliva mantém a higidez da mucosa bucal e dos dentes.

1.2- Estrutura das Glândulas Salivares

As glândulas salivares são compostas pelas parótidas, submandibulares, e sublinguais. As glândulas parótidas são maiores e inteiramente serosas, ou seja, sua secreção não contém mucina. As glândulas submaxilares e sublinguais são mistas (mucosas e serosas) e secretam saliva mais viscosa contendo mucinas. Os ácinos compreendem a parte inicial das glândulas, eles possuem células cúbicas e as suas característica diferem pelas suas propriedades funcionais: claras ou mucinogênicas e escuras ou zimogênicas. Além disso, os ácinos possuem uma rica irrigação sangüínea, e fibras nervosas que perfuram a membrana basal (GUYTON, & HALL 2002). O sistema tubular e os ductos excretorios das glândulas salivares se diferenciam em três porções:

- Túbulo intercalar, localizado próximo ao ácino, constituído por células cubóides.
- Túbulo estriado, localizado na região seguinte ao túbulo intercalar, é constituído por células epiteliais colunares, semelhantes às células tubulares do rim.
- Ducto excretor, localizado na região próxima ao túbulo estriado, é formado por dois tipos de células: as superficiais (epitélio colunar) e as basais (achatadas). Particularmente, as células basais são capazes de alterar o pH da saliva, secretando ou absorvendo HCO_3^- .

1.3- Digestão de Carboidratos na Boca e no Estômago

Quando o alimento é mastigado, ele é misturado com a saliva que contém enzima, como por exemplo, a ptialina. Essa enzima hidrolisa o amido do dissacarídeo maltose em outros polímeros pequenos de glicose que contém de 3 a 9 moléculas de glicose. Entretanto, o alimento permanece na boca por pouco tempo e depois a digestão do amido prossegue no corpo e no fundo do estômago durante até uma hora antes que o alimento seja misturado com as secreções gástricas (PORTO, 2001; GUYTON & HALL, 2002).

1.4- Mecanismo de Secreção Salivar

A secreção salivar é um processo ativo, ou seja, necessita de gasto de energia. Participam da secreção as células acinosas e as tubulares das três porções, da glândula, mencionadas anteriormente. A secreção primária é produzida pelas glândulas secretórias terminais junto com os canais intercalares; essa secreção é isotônica em relação ao plasma, porém a composição eletrolítica da secreção é constante com o plasma (Na^+ , K^+ , HCO_3^- e Cl^-). A secreção da amilase salivar ocorre quando os grânulos de zimogênio (provenientes das células acinares serosas) fundem-se com a membrana plasmática e liberam seu conteúdo para o lúmen do segmento terminal secretório por exocitose (DOUGLAS, 1999; PORTO, 2001).

1.5- Composição da Saliva

A saliva é uma solução aquosa, que apresenta como solvente a água e substâncias orgânicas e inorgânicas. A saliva tem uma composição química que varia de acordo com estímulos que o organismo recebe. A exemplo, estímulos gustativos excitam um tipo de secreção que é rica em enzimas, enquanto que outros estímulos mecânicos excitam uma secreção mucosa (BERNE & LEVY, 2000).

Normalmente, secreta-se 1 mL/min de saliva, sendo que 70% dessa quantidade é proveniente da glândula submandibular. Por ser realizado um trabalho osmótico para que ocorra a secreção salivar, esta se torna hiposmótica em relação ao plasma. No trabalho osmótico ocorre reabsorção de eletrólitos em nível dos túbulos intralobulares. Essa reabsorção talvez ocorra por transporte ativo, onde pode variar dependendo da ação dos hormônios do córtex supra-renal (mineralocorticóides). Nos quadros de desidratação, a osmolaridade da saliva aumenta, sugerindo um mecanismo de transporte de água pura, de forma similar como ocorre a desidratação ou diluição da urina nos rins. É importante ressaltarmos que a saliva excretada pelas parótidas é mais hialina, devido ao predomínio dos ácidos serosos, enquanto que a das submandibulares é mais espessa devido ao predomínio dos ácidos mucosos (DOUGLAS, 1999).

O pH salivar é ligeiramente ácido, variando de 5,75 a 7,05 sendo que este valor está intimamente ligado à concentração de CO₂ no sangue. Portanto, se a quantidade de CO₂ livre no sangue aumentar, conseqüentemente, haverá também um aumento na saliva, fazendo com que o pH torne-se menos ácido. Com isso, novamente a glândula salivar estará se comportando de forma similar ao rim, na sua função urinária (BERNE & LEVY, 2000; GUYTON & HALL, 2002).

1.6- Componentes Orgânicos da Saliva

As substâncias orgânicas mais importantes na saliva são: uréia, creatinina, ácido úrico e aminoácidos como a glicose, que geralmente são eliminados em baixas concentrações por serem dependentes da taxa plasmática. Na parte protéica, destacam-se as glicoproteínas representadas pela mucina, que confere a característica de secreção mucosa e apresenta propriedades físico-químicas da saliva; além de apresentarem um alto peso molecular, as glicoproteínas da saliva, também possuem uma alta taxa de ácido siálico, hexurônico e hexosamina. Outras proteínas salivares são: amilase salivar (conhecida como ptialina), lipase salivar, lisozimas (glicoproteína de ação bacteriolítica), calicreína tecidual (polipeptídeo de ação proteolítica), imunoglobulinas (IgA, IgG e IgM) e as substâncias protéicas solúveis que são substâncias específicas dos grupos sanguíneos, similares aos aglutinogênios dos eritrócitos. A Tabela I sumaria outras substâncias encontradas na saliva em menor quantidade (BERNE & LEVY, 2000; GUYTON & HALL, 2002).

Tabela I: Substâncias encontradas na saliva em concentrações reduzidas.

Outras substâncias salivares	
Proteínas	Funções
Fosfatase ácida Colônio esterase Ribonuclease	Presente nas secreções da parótida e submandibular
Lipase	Atua em alimentos gordurosos
Peroxidase	Inibe microorganismos
Lactoferrina	Propriedade bactericida
Histadina	Ação antifúngica

Fonte: (Douglas, 1999)

1.7- Substâncias Inorgânicas da Saliva

Os componentes inorgânicos mais importantes encontrados na saliva são:

- 1) **Cloreto** → Varia em relação a taxa de fluxo e possui taxa inferior a plasmática.
- 2) **Bicarbonato** → Varia segundo o fluxo salivar e pode exceder a taxa plasmática.
- 3) **Fosfato** → Atinge uma concentração superior a do plasma e não depende da taxa de fluxo.
- 4) **Iodeto** → Varia de 100 a 200 vezes quando comparado às do plasma, mas seu mecanismo de transporte não depende do hormônio TSH (hormônio tireo estimulante) da hipófise, como ocorre na glândula tireóide.
- 5) **Brometo** → Possui concentração maior que no plasma e varia em relação a taxa de fluxo.
- 6) **Fluoreto** → É importante nos tratamentos de prevenção às cáries. Possui concentrações baixas e sobre seu mecanismo de eliminação, acredita-se que seja igual ao do cloreto.
- 7) **Sódio** → Varia em relação à taxa de fluxo e sua concentração é muito variável.
- 8) **Potássio** → Sua concentração é superior a do plasma.
- 9) **Cálcio** → Varia em relação à taxa de fluxo e sua concentração é muito variável.

1.8- Controle Endócrino da Secreção Salivar

Foi observado que as glândulas salivares de ratos apresentavam um dimorfismo sexual que desaparecia quando era injetado hormônios sexuais invertidos nos animais. Observou-se também que a castração produzia atrofia e redução do conteúdo de α -amilase e protease da glândula salivar. Portanto, esse

fato indica que ocorre a ação das gônadas sobre a função salivar. Dados da literatura mostram que, através de mecanismos do controle endócrino, é possível regular a função da glândula salivar, adaptando-se a condições funcionais diferentes. Além disso, é provável que a etiopatogenia de alterações bucais, esteja relacionada às influências dos hormônios na função da glândula salivar (BERNE & LEVY, 2000; DOUGLAS, 1999; GUYTON & HALL, 2002).

1.9- Regulação Nervosa da Secreção Salivar

A secreção salivar é regulada, principalmente, por sinais nervosos parassimpáticos provenientes dos núcleos salivatórios superior e inferior no tronco cerebral. Os núcleos salivatórios são excitados tanto por estímulos gustatórios, quanto por estímulos táteis procedentes da língua e de outras áreas da boca e da faringe. Quando uma pessoa cheira ou ingere alimentos que gosta, a salivação é muito maior quando comparado àqueles alimentos de que não gosta. Isso sugere que a salivação pode ser estimulada ou inibida por sinais nervosos que chegam aos núcleos salivatórios provenientes de centros superiores do sistema nervoso central. A área do apetite do encéfalo que regula parte desses efeitos funciona, muitas vezes, em resposta a sinais provenientes das áreas do paladar e do olfato do córtex cerebral. Além disso, a salivação também pode servir para ajudar a diluir um fator irritante do estômago e ajudá-lo a diluir os alimentos, neutralizando as substâncias que estão causando a irritação. Isto posto, a salivação pode ocorrer em resposta a reflexos que estão sendo originados no estômago ou na porção superior do intestino, quando o indivíduo sente náuseas ou degluti substâncias irritantes ao estômago (ROSATELLI et al., 2002).

Os nervos simpáticos ajudam na secreção salivar, porém em número bem menor que a estimulação simpática. Eles originam-se dos gânglios cervicais superiores e seguem seu trajeto ao longo dos vasos sanguíneos até as glândulas salivares (ROSATELLI et al., 2002).

Um outro efeito que pode afetar a secreção salivar é o suprimento sanguíneo das glândulas. Trabalhos mostram que a própria saliva dilata diretamente os vasos sanguíneos e proporciona maior nutrição para as células secretoras, e este efeito vasodilatador é produzido pela calicreína, que é um componente orgânico da saliva e atua como uma enzima transformando a α 2-microglobulina, para formar a bradicinina, que é um potente vasodilatador (ROSATELLI et al., 2002).

2.1- Nicotina x Efeitos Metabólicos

O tabaco (componente do cigarro) é uma planta cultivada por suas folhas, que são fumadas, mascaradas ou aspiradas, produzindo uma variedade de efeitos. É considerada uma substância que causa dependência, pois contém nicotina, um agente químico (SILVA, 2003)

A nicotina tem efeitos depressivos sobre o corpo. O tônus e a atividade intestinal aumentam, assim como a produção de saliva e as secreções brônquicas. A estimulação do sistema nervoso central pode causar tremores no consumidor inexperiente, ou até mesmo convulsões, se a dose for alta. O estímulo é seguido por uma fase que deprime os músculos respiratórios. Como agente produtor de euforia, a nicotina provoca excitação e relaxamento nas situações estressantes. Em média, o uso do tabaco aumenta a frequência cardíaca de 10 a 20 batidas por minuto, e aumenta a medida da pressão sanguínea de 5 a 10 milímetros de mercúrio (já que contrai os vasos sanguíneos). A nicotina também pode aumentar a diaforese (sudorese), e produzir náuseas e diarreia, em razão de seus efeitos sobre o sistema nervoso central. Os efeitos da nicotina sobre as atividades hormonais do corpo também são evidentes. Ela eleva o nível de glicose no sangue e aumenta a produção de insulina. A nicotina também tende a aumentar a agregação plaquetária, que pode levar a episódios trombóticos (coágulos sanguíneos) (GUYTON, 2002; PORTO, 2001)

A dependência que o tabaco causa tem sido bem documentada. O tabaco é considerado um modificador do humor e comportamento, e também um agente psicoativo, cujo uso tende a ser abusivo. Como um agente farmacológico multissistêmico que é administrado de forma voluntária, acredita-se que tenha um potencial vicioso maior comparado ao do álcool, cocaína e morfina (SILVA, 2003; PORTO, 2001).

2-Objetivos

Posto que dados literários apontam um aumento do volume da secreção salivar em indivíduos fumantes ativos, este trabalho tem como objetivo principal a análise bioquímica dos níveis de proteínas totais na saliva de indivíduos fumantes ativos e não fumantes.

3-Materiais e Métodos

Neste estudo selecionamos 27 voluntários com idades variando entre 19-25 anos dos quais foram divididos em três grupos: (1) indivíduos fumantes ativos (igual ou superior a 10 cigarros/dia), (2) indivíduos fumantes ativos (menos que 10 cigarros/dia) e (3) indivíduos não fumantes, sendo estes indivíduos controles. Todos os voluntários foram selecionados no Centro Universitário de Araraquara-UNIARA .

Para a colheita da saliva, os voluntários foram orientados em relação a lavagem da cavidade oral (bochecho) com água mineral sendo posteriormente colhido após alguns minutos a saliva por escoamento em tubos de ensaio na quantidade de aproximadamente 2 mL. A seguir, a saliva foi centrifugada a 2000 g por 10 minutos, em temperatura ambiente e o sobrenadante foi armazenado em eppendorfs plásticos a -20°C, até o momento de sua utilização.

Para a quantificação das proteínas totais na saliva foi utilizado o método de LOWRY et al. (1951), o qual se fundamenta na coordenação das ligações

peptídicas com o cobre, em meio alcalino, seguida da redução dos ânions fosfomolibdato e fosfotungstato do reagente de Folin, pelos resíduos de tirosina e triptofano das proteínas. Nessa reação, ocorre a formação de um produto de coloração azul, que é proporcional à quantidade de proteína e à intensidade colorimétrica, essa, quantificada em espectrofotômetro a 660 nm. As dosagens serão efetuadas em duplicata e uma média dos valores foi utilizada para comparação das absorvâncias com a curva padrão de soroalbumina bovina. Os valores serão expressos em mg de proteína/mL de saliva. As análises estatísticas foram realizadas através de testes não paramétricos.

4-Resultados e Discussões

A Tabela II ilustra a caracterização dos voluntários (idade, sexo) inseridos neste trabalho.

Tabela II: Caracterização dos voluntários selecionados

Controle			Grupo II Fumantes < 10 cigarros /dia			Grupo I Fumantes >10 cigarros /dia		
Voluntário	Idade	Sexo	Voluntário	Idade	Sexo	Voluntário	Idade	Sexo
1-CHBB	20	M	4- RBA	22	F	1-ERDS	21	M
2-MNH	22	F	2-REF	21	F	2-CSM	19	F
3-HUI	25	F	3-TRE	24	F	3-MD	23	F
4-MKL	23	F	4-GR	22	F	4-HJU	23	F
5-MHJ	20	M	5-AMR	21	F	5-GT	20	M
6-JU	24	M	6-ABO	25	F	6-TRE	24	M
7-MNO	21	F	7-AFR	21	M	7-MJU	20	F
8-MJ	20	F	8-TP	20	M	8-MHT	21	F
9-LOY	25	F	9-TRO	25	M	9-ABOM	24	F

(33% ♂, 67% ♀) (19 – 25 anos)

A Tabela III e a figura 1 ilustram os valores obtidos na dosagem de proteínas totais na saliva dos indivíduos fumantes (grupos 1 e 2) e não fumantes, expressos em mg/mL.

Tabela III: Dosagem de Proteínas Totais na Saliva (mg/mL)

CONTROLE	Grupo II Fumantes < 10 cigarros/dia	Grupo I Fumantes >10 cigarros/dia
1- 15.366	4- 18.78	1- 22.69
2- 16.00	2- 18.00	2- 23.10

3- 16.12	3- 19.35	3- 32.76
4- 15.98	4- 19.95	4- 20.36
5- 13.65	5- 17.16	5- 19.200
6- 19.10	6- 20.30	6- 29.380
7- 15.80	7- 18.79	7- 21.665
8- 14.21	8- 18.02	8- 20.350
9- 16.51	9- 19.53	9- 25.036
Média = 15.50	Média = 18.78	Média = 22.69
Mediana = 15.50	Mediana = 18.79	Mediana = 21.66
IC = 14.320 – 16.50	IC = 18.027 – 19.53	IC = 20.350 – 25.03

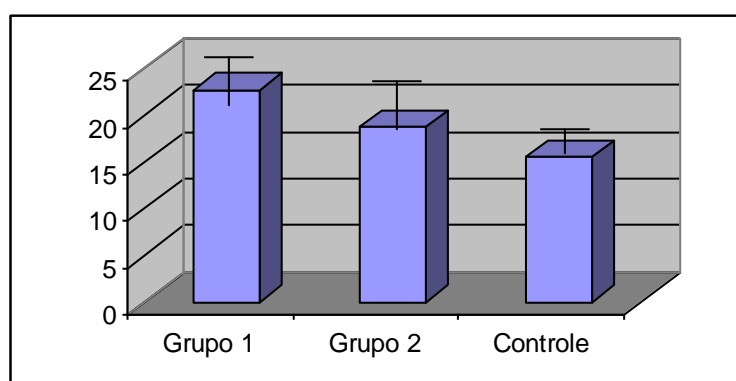


Figura 1: Valores medianos das dosagens de proteínas totais na saliva de indivíduos fumantes nos grupos 1, 2 e controle (grupo 1 > 10 cigarros/dia e grupo 2 < 10 cigarros dia) e grupo controle.

Os níveis de proteínas totais na saliva dos indivíduos fumantes do grupo 1 (mediana: 21,69 mg/mL saliva) apresentaram aumentos significativos em relação aos indivíduos não fumantes (mediana: 15,50 mg/mL saliva), sendo o valor de $p=0,0022$ (figura 2).

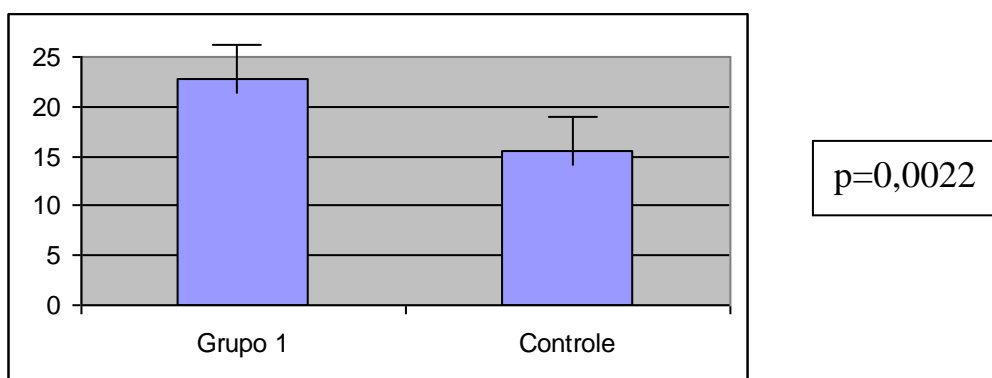


Figura 2: Valores medianos das dosagens de proteínas totais na saliva de indivíduos fumantes (grupo 1 > 10 cigarros/dia) e grupo controle.

Os níveis de proteínas totais na saliva dos indivíduos fumantes do grupo 2 (mediana: 18,7 mg/mL saliva) apresentaram aumentos significativos em relação aos indivíduos não fumantes (mediana: 15,50 mg/mL saliva), sendo o valor de $p=0.0009$ (figura 3).

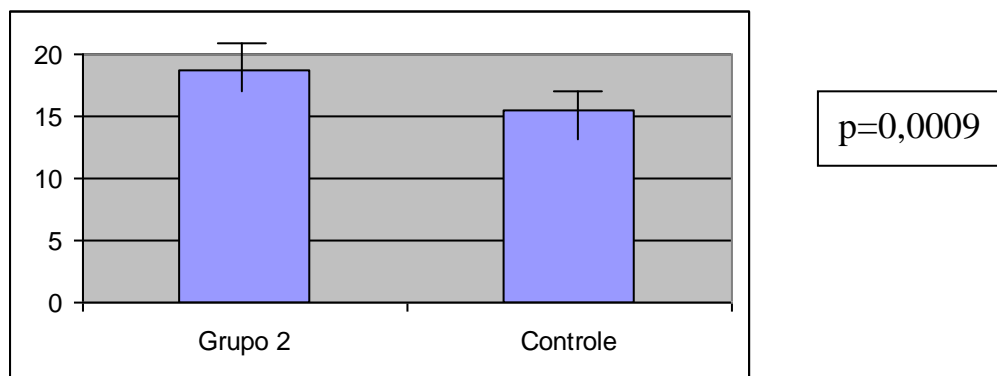


Figura 3: Valores medianos das dosagens de proteínas totais na saliva de indivíduos fumantes (grupo 1 > 10 cigarros/dia) e grupo controle.

5-Conclusões

Este trabalho nos permite sugerir que:

- (1) A análise dos níveis de proteínas totais na saliva de indivíduos fumantes foram aumentadas em relação aos achados observados nos indivíduos não fumantes;
- (2) Existe uma correlação significativa entre os níveis de proteína salivar e quantidade de cigarro utilizada por dia entre os dois grupos de fumantes analisados;
- (3) A nicotina além de estimular a secreção salivar, provoca alteração na composição protéica da saliva.

7- Referências

Berne, R.M. & Levy, M.N.; **Fisiologia**. Editora Guanabara Koogan, 4ª Edição, Rio de Janeiro, 2000.

Douglas, C.R.; **Tratado de Fisiologia Aplicada à Ciência de Saúde**. Editora Robe editorial, 4ª Edição, São Paulo, 1999.

Guyton, A.C. & Hall, J.E.; **Fisiologia Humana** . Editora Guanabara Koogan, 9ª Edição, Rio de Janeiro, 2002.

Hernández, C.C.C.; Donadi, E.A. ; Reis, M.L. Kininogen-Kallikrein-Kinin system in plasma and saliva of patients with sjogre`s syndrome. **J. Reumatol.** , V. 25,p. 1 – 4, 1998 [1].

Hernández, C.C.C.; Donadi, E.A. ; Reis, M.L. Kininogen-Kallikrein-Kinin system in plasma and saliva of patients with arthritis. **Immunopharmacology** , V. 33, 2002 [2].

Lowry, O. H.; Rosebrough, N.J.; Farr, ^aL.; Randall,R.J. Protein measurement with folin phenol reagent. **J.Biol.Biochem.**, V.193, p. 265 – 275, 1951.

Porto, C.C.; **Semiologia Médica**. Editora Guanabara Koogan, 4^a Edição, Rio de Janeiro, 2001.

Rosatelli J.B.; Tese de Doutorado apresentada à faculdade de medicina de Ribeirão Preto. “ Avaliação Do Sistema Cininogênio-Calicreína-Cinina No Penfigo Foliáceo Em Atividade; Ribeirão Preto, 2002.

Silva, F. **Uso de tabaco para fumar**, <http://www.fernandoparedefumar.hpg.ig.com.br/frame-1.htm>, **site consultado em 12/maio/2003.**