

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

Daniel Berretta Moreira Alves

Cirurgião-Dentista

**ESTUDO DA EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DE SPLUNC1,  
SPLUNC2 E LPLUNC1 NAS GLÂNDULAS SALIVARES, LÍNGUA E PALATO  
DE FETOS HUMANOS.**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do Título de Mestre em Estomatopatologia na área de Estomatologia.

Orientador: Prof. Dr. Pablo Agustin Vargas

**PIRACICABA  
2010**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**

Bibliotecária: Marilene Girello – CRB-8ª. / 6159

Alves, Daniel Berretta Moreira.

AL87e      Estudo da expressão imunoistoquímica de SPLUNC1, SPLUNC2 e LPLUNC1 nas glândulas salivares, língua e palato de fetos humanos. / Daniel Berretta Moreira Alves. -- Piracicaba, SP: [s.n.], 2010.

Orientador: Pablo Agustin Vargas.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Imunidade. 2. Morfogênese. 3. Saliva. 4. Desenvolvimento embrionário. I. Vargas, Pablo Agustin. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título. (mg/fop)

Título em Inglês: Immunohistochemical expression study of SPLUNC1, SPLUNC2 and LPLUNC1 in salivary glands, tongue and palate of human fetus

Palavras-chave em Inglês (Keywords): 1. Immunity. 2. Morphogenesis. 3.

Saliva. 4. Embryonic development

Área de Concentração: Estomatologia

Titulação: Mestre em Estomatopatologia

Banca Examinadora: Pablo Agustin Vargas, Sílvia Vanessa Lourenço, Andréia Aparecida da Silva

Data da Defesa: 22-02-2010

Programa de Pós-Graduação em Estomatopatologia



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada em 22 de Fevereiro de 2010, considerou o candidato DANIEL BERRETTA MOREIRA ALVES aprovado.

A blue ink signature of Prof. Dr. Pablo Agustin Vargas, written in a cursive style.

Prof. Dr. PABLO AGUSTIN VARGAS

A blue ink signature of Profa. Dra. Andréia Aparecida da Silva, written in a cursive style.

Profa. Dra. ANDRÉIA APARECIDA DA SILVA

A blue ink signature of Profa. Dra. Silvia Vanessa Lourenço, written in a cursive style.

Profa. Dra. SILVIA VANESSA LOURENÇO

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a meus pais, **Telmo Moreira Alves e Nádia V. Berretta Moreira Alves**, exemplos de amor, dedicação e sacrifício. Seus exemplos sempre serão meu horizonte. Seu apoio meu porto seguro, e nossos sonhos continuarão sendo meus objetivos.

## AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A **Deus**, por sempre me iluminar na minha caminhada.

Aos meus irmãos **Leonardo, Luciana e Cíntia**, e a **Geralda**, por sempre acreditarem e compartilharem dos meus sonhos, mesmo quando eles ainda pareciam muito distantes. O apoio de vocês foi essencial para este momento.

À minha namorada **Mariana Cardoso da Silva**, pelo seu amor e compreensão incondicional. Agradeço pela sua dedicação e apoio para que momentos como esse se tornem possíveis.

### À minha família:

Meus avôs: **Walmor Berretta e Bela Berretta** (*in memoriam*) e em especial à minha avó **Nazaré Moreira** pela convivência e os conselhos dados.

Meu tio **Ewandro Berretta**, minha inspiração para escolher essa profissão.

Minha tia **Magda Berretta** e sua família, pelo apoio em São Paulo e por me fazerem sentir em casa, mesmo estando muito distante dela.

Aos meus outros tios e primos, pelo carinho e apoio.

Ao **Prof. Pablo Agustin Vargas**, pela amizade, paciência e a confiança depositada em mim. Agradeço pelos ensinamentos e conselhos, que serão usados com dedicação na minha vida profissional.

À **Dra. Sílvia Lourenço**, pelo material utilizado nesse trabalho, além de sua simpatia e disponibilidade para ajudar.

À **Dra Lynne Bingle**, do Departamento de Patologia Oral da Universidade de Sheffield, pelo apoio e colaboração para que este trabalho se concretizasse.

Ao **Prof. Oslei Paes de Almeida**, pela sua busca incansável pelo conhecimento, que sempre me servirá de exemplo.

“A arte de ensinar consiste em começar ensinando primeiro a si mesmo.”

**Carlos Bernardo González Pecotche**

## **AGRADECIMENTOS:**

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, na pessoa de seu diretor, **Prof. Dr. Francisco Haiter Neto**.

Ao coordenador geral da Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, **Prof. Dr. Jacks Jorge Junior**

Ao **Prof. Dr. Ricardo Della Coletta** coordenador do programa de Pós-Graduação em Estomatopatologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas.

Aos **Profs. Drs. Oslei Paes de Almeida, Edgard Graner, Ricardo Della Coletta, Márcio Ajudarte Lopes, Pablo Agustin Vargas e Jacks Jorge Júnior**, professores das áreas de Patologia e Semiologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP, por todos os ensinamentos transmitidos.

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)**, pela concessão de bolsa de estudos.

Aos Professores da disciplina de Diagnóstico Integrado do Curso de Odontologia do Centro Universitário do Pará, **Antônio Athayde, Manuel Fernando Costa, Maria das Graças Pinheiro e Sérgio Alves** pelos primeiros ensinamentos nas áreas de patologia, estomatologia e radiologia e em especial ao **Prof. Fabrício Tuji**, pelos seus ensinamentos e sua amizade.

Aos meus grandes amigos de pós-graduação:

**Patrícia do Socorro Feio**, por sua serenidade, companheirismo e principalmente pela força e conselhos em todos os momentos;

**Andréia Bufalino**, por sua alegria e espontaneidade;

**Renato Hopp**, por seu humor e descontração;

**Bruno Benevenuto**, por sua simplicidade, dedicação e disponibilidade para ajudar;

**Victor Toral**, pelo intercâmbio de culturas, pela ajuda e principalmente por seu companheirismo;

**Wilfredo Gonzalez**, pelo intercâmbio de culturas, pelos momentos de descontração e principalmente por sua amizade;

**Marisol Martinez, Lays Sobral, Manoela Carrera, Ana Carolina Ribeiro, Adriele Gouvêa, Katya Pulido e Camila Beder**. Pelos ensinamentos, pela convivência e principalmente pelos momentos de descontração que podemos compartilhar durante esse período, tornando minha estadia em Piracicaba mais alegre.

Aos demais amigos e colegas de pós-graduação em Estomatopatologia, **Marco Aurélio de Andrade, Rose Ortega, Fernanda Basso, Jorge Esquiche, Fabiana Seguin, Fernanda Mariano, Rogério Gondak, Sibeles Aquino, Andréia da Silva, Luiz Gueiros, Rebeca Azevedo, Juliana Moraes, Michele Kellerman, Alan Roger Silva, Ana Teresinha Mesquita, Carolina Bitu, Débora Campanella Bastos, Lília Rocha, Lívia Paranaíba, Marco Antonio Carvalho, Mario Romañach e Michelle Agostini**.

Aos funcionários do laboratório de Patologia, **Valéria Franco, Adriano Luís Martins, João da Silva Júnior, Geovânia Almeida e Fabiana Casarotti**.

Às Dras. **Thais Mauad e Sheila Aparecida Coelho Siqueira** do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Às funcionárias do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo: **Vera Noya, Liduvina Barros e Zilá Irina Pieroni**.



Aos amigos paraenses exilados: **Armando Lopes Pereira, Ricardo Carvalho, Patrícia Feio, Gustavo Brandão, Juliana Melo e Lucas Moura**, que em Bauru ou aqui em Piracicaba, sempre me ajudaram a não perder os costumes da minha querida terra.

À amiga de graduação: **Paula Lopes**, que sempre torceu por mim.

Aos amigos do Pará: **Rafael e Gabriel Resque, Rodrigo e Cecília Pinheiro, Marcelo Pinheiro, Cledenilson Araujo, Cláudio André, Ronaldo Batalha, Marlene Escher, Vinicius Siraiama, Rodrigo Amanajás, Igor Carneiro, Márcio Passos, Bruno Figueiredo, Bruno Campos, Fernanda Farias e Ricardo Branches**, pelos bons momentos de alegria e convivência.

## **EPIGRAFE**

“É melhor atirar-se à luta em busca de dias melhores, mesmo correndo o risco de perder tudo, do que permanecer estático, como os pobres de espírito, que não lutam, mas também não vencem, que não conhecem a dor da derrota, nem a glória de ressurgir dos escombros. Esses pobres de espírito, ao final de sua jornada na Terra não agradecem a Deus por terem vivido, mas desculpam-se perante Ele, por terem apenas passado pela vida.”

**Robert Nesta Marley**

## RESUMO

**INTRODUÇÃO:** As proteínas da família PLUNC (“palate, lung and nasal epithelium clone”), as quais são expressas no trato aéreo superior e na cavidade bucal humana, podem ser responsáveis por mediar a resposta imune inata e interagir com a superfície bacteriana. Entretanto, sabe-se muito pouco sobre a expressão destas proteínas nas glândulas salivares durante o período embrionário humano. **OBJETIVO:** O objetivo do presente estudo foi analisar a expressão imunoistoquímica de SPLUNC1, SPLUNC2 e LPLUNC1 em glândulas salivares maiores e menores, língua e palato de fetos humanos. **MATERIAIS e MÉTODOS:** A amostra do presente estudo foi composta por 26 fetos humanos com idade variando entre 12 e 25 semanas de vida intra-uterina. As glândulas parótidas (n=7), submandibulares (n=13) e sublinguais (n=5) e as glândulas salivares menores [lábio (n=18), palato (n=9) e língua (n=6)] foram classificadas de acordo com os estágios de morfodiferenciação. A marcação imunoistoquímica citoplasmática das glândulas salivares, epitélio respiratório palatino e epitélio lingual, foi avaliada como positiva ou negativa. **RESULTADOS:** Dentre os 26 fetos avaliados, 13 (50%) apresentaram positividade para SPLUNC1 nos plugues de mucina dos ductos estriados e no citoplasma dos ácinos mucosos. Os dois casos positivos para LPLUNC1 apresentaram expressão citoplasmática na porção apical das células do ducto estriado primitivo. Nenhum dos casos apresentou marcação positiva para os anticorpos SPLUNC2A e SPLUNC2B. Os estágios de morfodiferenciação avançados (estágio canalicular e broto terminal) prevaleceram entre os fetos que apresentaram positividade para SPLUNC1. Tecidos que estavam adjacentes as glândulas salivares avaliadas, como células do epitélio respiratório associado à região do palato (n=6) e curiosamente, do epitélio escamoso de superfície da língua associado às glândulas salivares menores da região lingual (n=3), também apresentaram marcação positiva para SPLUNC1. Os resultados do presente estudo sugerem que a expressão de SPLUNC2 em glândulas salivares inicia na vida pós-natal. A expressão da proteína LPLUNC1

nas células ductais durante a vida intra-uterina precisa ser melhor estudada, visto que apenas dois casos foram positivos para esta proteína. **CONCLUSÕES:** A proteína SPLUNC1 inicia sua expressão durante a vida intra-uterina, nas glândulas salivares em estágio de morfodiferenciação avançado (estágio canalicular e broto terminal). Estudos com métodos mais sensíveis devem ser realizados para avaliar e quantificar a expressão de SPLUNC1 e LPLUNC1 em glândulas salivares maiores e menores de fetos humanos, visando entender melhor a função destas proteínas na vida intra-uterina.

**Palavras Chave:** Gene *PLUNC*, Imunidade, Imunoistoquímica, Morfogênese, Saliva, Desenvolvimento Embrionário.

## ABSTRACT

**OBJECTIVES:** The expression of PLUNC proteins in human fetal tissue has not been previously studied. The aim of this study, therefore, was to determine expression in major and minor salivary glands, tongue and palate throughout fetal development and thus gain further insight into the function of these proteins.

**MATERIALS AND METHODS:** 26 human fetuses (12 to 25 intra-uterine weeks) were collected retrospectively. Parotid (n=7), submandibular (n=13), sublingual (n=5) and minor salivary glands [lips (n=18)], palate (n=9) and tongue (n=6)] were classified according to their morphodifferentiation stage. Immunohistochemical analysis of three PLUNC proteins (SPLUNC1, SPLUNC2 and LPLUNC1) was performed and immunoreactivity was assessed as positive or negative. **RESULTS:**

Mucin plugs in striated ducts and mucous cells of submandibular (n=4, 30.77%), sublingual (n=4, 80%) and minor salivary glands (n=9, 27.27%) were positive for SPLUNC1. The apical portion of primitive striated duct cells of submandibular and sublingual salivary glands was positive for LPLUNC1 (n=2). SPLUNC1 was detected in late morphodifferentiation stages (canalicular stage and terminal bud stage) of salivary glands. Tissues adjacent to the minor salivary glands, such as respiratory epithelial cells located in the palate (n=6) and squamous epithelial cells of the tongue surface (n=3), were also positive for SPLUNC1. All cases (n=26) were negative for SPLUNC2. **CONCLUSIONS:** Our results suggest that SPLUNC2, the major PLUNC protein in adult salivary glands, is either expressed very late in fetal development or only in adult tissues. Only 2 cases of LPLUNC1 protein in fetal duct cells were positive; further studies are needed to confirm expression. Salivary glands expressed SPLUNC 1 only in late morphodifferentiation stages (canalicular and terminal bud stages). Further studies using other sensitive methods, such as in situ hybridization, should be performed to assess and quantify the expression of SPLUNC 1 and LPLUNC1 in major and minor salivary glands, tongue and palate in order to better understand their function in intra-uterine life.

**Key words:** *PLUNC* gene, Immunity, Immunohistochemistry, Morphogenesis, Saliva, Embryonic Development.

## LISTA DE ABREVEATURAS E SIGLAS

|               |                                                                  |
|---------------|------------------------------------------------------------------|
| BASE          | do inglês <i>Breast cancer and salivary expressed</i>            |
| BPI           | Proteína de aumento da permeabilidade bactericida                |
| BSP30         | Proteína secretora bovina                                        |
| CNF           | Carcinoma nasofaríngeo                                           |
| FC            | Fibrose cística                                                  |
| IFN- $\gamma$ | Interferon gama                                                  |
| Ig            | Imunoglobulina                                                   |
| IL            | Interleucina                                                     |
| kb            | kilobase                                                         |
| LBP           | Proteína de ligação para lipopolissacarídeos                     |
| LPLUNC        | do inglês <i>Long palate, lung, nasal epithelium clone</i>       |
| LPS           | Lipopolissacarídeo                                               |
| LUNX          | Proteínas X específicas do pulmão                                |
| MHC           | Molécula de histocompatibilidade principal                       |
| Mp            | <i>Mycoplasma pneumoniae</i>                                     |
| NK            | do inglês <i>Natural Killer</i>                                  |
| PAS           | do inglês <i>Periodic acid-Schiff</i>                            |
| pb            | Pares de bases                                                   |
| PBS           | Tampão fosfato salino                                            |
| PCR           | do inglês <i>Polymerase chain reaction</i>                       |
| PLUNC         | do inglês <i>Palate, lung, nasal epithelium clone</i>            |
| PSP           | Proteína secretora da parótida                                   |
| QGH           | Queratinócitos gengivais humanos                                 |
| RT-PCR        | do inglês <i>reverse transcription polymerase chain reaction</i> |
| SBGB          | Proteína B da glândula submandibular                             |
| SLIP          | do inglês <i>secretory leukocyte protease inhibitor</i>          |
| SPLUNC        | do inglês <i>short palate, lung, nasal epithelium clone</i>      |
| SPURT         | Proteína de secreção do trato respiratório superior              |

|     |                                     |
|-----|-------------------------------------|
| TLR | do inglês <i>toll like receptor</i> |
| TNF | Fator de necrose tumoral            |
| VIU | Vida intra-uterina                  |



## **SUMÁRIO**

|                                                                            |           |
|----------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1-INTRODUÇÃO .....</b>                                                  | <b>1</b>  |
| <b>2-REVISÃO DE LITERATURA .....</b>                                       | <b>3</b>  |
| <b>2.1- Desenvolvimento das Glândulas Salivares, Língua e Palato .....</b> | <b>3</b>  |
| 2.1.1 Glândula Parótida .....                                              | 5         |
| 2.1.2 Glândula Submandibular .....                                         | 6         |
| 2.1.3 Glândula Sublingual .....                                            | 7         |
| 2.1.4 Glândulas Salivares Menores .....                                    | 8         |
| 2.1.5 Palato .....                                                         | 10        |
| 2.1.6 Língua .....                                                         | 11        |
| <b>2.2- Sistema Imune Inato .....</b>                                      | <b>12</b> |
| <b>2.3- PLUNC .....</b>                                                    | <b>17</b> |
| 2.3.1 Descrição de PLUNC .....                                             | 17        |
| 2.3.2 Membros da família PLUNC .....                                       | 18        |
| 2.3.3 Funções de PLUNC .....                                               | 19        |
| 2.3.4 Expressão da proteína PLUNC .....                                    | 21        |
| <b>3-PROPOSIÇÃO .....</b>                                                  | <b>32</b> |
| <b>4-MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>                                         | <b>33</b> |
| <b>4.1- Caracterização da Amostra .....</b>                                | <b>33</b> |
| <b>4.2- Estágios de Morfodiferenciação das glândulas salivares .....</b>   | <b>36</b> |
| <b>4.3- Reações de Imunoistoquímica: protocolo das reações .....</b>       | <b>39</b> |
| <b>4.4- Avaliação da marcação Imunoistoquímica .....</b>                   | <b>40</b> |

|                           |           |
|---------------------------|-----------|
| <b>5-RESULTADOS .....</b> | <b>41</b> |
| <b>6-DISCUSSÃO .....</b>  | <b>58</b> |
| <b>7-CONCLUSÕES .....</b> | <b>64</b> |
| <b>REFERÊNCIAS .....</b>  | <b>65</b> |
| <b>ANEXO .....</b>        | <b>71</b> |

## 1-INTRODUÇÃO

O organismo tem dois tipos de resposta frente à invasão de um patógeno: a resposta inata e a adaptativa. Os mecanismos da imunidade inata são a primeira linha de defesa contra a infecção, estão sempre presentes e podem ser ativados rapidamente, no entanto, nem sempre têm a capacidade de eliminar a infecção. Muitas moléculas associadas à resposta inata interagem especificamente com a superfície bacteriana. Em humanos, duas proteínas são críticas na mediação dos sinais contra bactérias gram-negativas: são as proteínas ligadoras aos lipopolissacarídeos (LBP) e proteína de aumento de permeabilidade bactericida (BPI) (Bingle & Craven, 2003).

O reconhecimento precoce dos antígenos bacterianos é crítico para a sobrevivência humana. Os lipopolissacarídeos (LPS) que são constituintes das paredes de bactérias gram-negativas, ácidos lipoteicóico de bactérias gram-positivas e lipoarabinomananas de micobactérias apresentam um intenso efeito crítico. Em sepse, muitos tipos celulares, incluindo neutrófilos e macrófagos, respondem a esses constituintes ativando potentes mediadores inflamatórios (Bingle & Craven, 2002).

Uma família de proteínas denominada PLUNC (palate, lung and nasal epithelium clone) descrita primeiramente no epitélio embrionário do palato e fossas nasais de ratos e no epitélio traqueobronquial do pulmão de ratos adultos (Weston *et al.* 1999), são responsáveis por mediar a resposta imune inata e interagir com a superfície bacteriana (Bingle & Craven, 2003).

A família PLUNC, recentemente localizada no cromossomo 20q11.2, é expressa no trato respiratório superior e cavidade oral (Zhou *et al.*, 2006), sendo constituída por 7 membros, subdividida em “short” (SPLUNC) e “long” (LPLUNC) (Bingle *et al.*, 2004).

Existem poucos trabalhos na literatura avaliando a expressão dessa família de proteínas em glândulas salivares no período embrionário humano. Nosso laboratório de Patologia da FOP-UNICAMP vem realizando trabalhos

conjuntos com o Laboratório de Patologia da Universidade de Sheffield (Inglaterra) no intuito de melhor entender a expressão e função dessas proteínas nos tecidos localizados na região de cabeça e pescoço de pacientes saudáveis, HIV+, e com tumores de glândulas salivares (Vargas *et al.*, 2008; Silva, 2009). Entretanto, estudos adicionais ainda são necessários para compreender melhor o papel dessa família de proteínas na resposta imune inata e vários tipos de doenças que afetam os seres humanos.

## 2-REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 – Desenvolvimento das Glândulas Salivares, Língua e Palato.

Uma glândula salivar origina-se como um espessamento focal do epitélio bucal que cresce em direção ao ectomesênquima subjacente, formando um pequeno broto conectado à superfície por um cordão epitelial. Ao mesmo tempo, células do ectomesênquima condensam-se em torno desse broto, sendo tal fase do desenvolvimento semelhante de um broto dentário em formação. O bulbo epitelial fende-se, a seguir, para formar um ou mais novos brotos, processo que se continua, constituindo várias gerações e ramificações hierárquicas da glândula (Dale, 2001).

O broto sólido do epitélio oral cresce interiormente para a região mesenquimal, onde será estimulado a formar fissuras que subdividem o broto epitelial inicial em um epitélio altamente ramificado. Depois, os brotos finais e o sistema de ductos ramificados formam um lúmen central e as células se diferenciam em uma barreira epitelial com uma camada basal. Nas glândulas submandibulares e sublinguais, o padrão de ramificação é compacto, enquanto que na glândula parótida, a ramificação do epitélio é mais frouxa, com mais espaço entre os cordões epiteliais crescentes. Nos humanos, esses eventos ocorrem durante o período de 8 a 18 semanas de gestação (Denny *et al.*, 1997).

Segundo Denny *et al.* (1997), após os ductos ramificados rudimentares formarem uma barreira epitelial coesa, as células irão demonstrar seus primeiros sinais de diferenciação secretora de proteínas, através da formação extensiva de retículo endoplasmático rugoso, ativação do complexo de Golgi e da secreção dos primeiros grânulos. Entretanto, Redman & Sreebny (1971) demonstraram que na glândula parótida de ratos, esse desenvolvimento é mais lento, ocorrendo a formação dos primeiros grânulos somente depois do nascimento.

Antes do nascimento, é possível observar a secreção de mucina nas glândulas salivares maiores e menores, enquanto o zimógeno começaria a ser

liberado na etapa pós-natal. As secreções fetais das glândulas salivares seriam importantes tanto para a produção de glicoconjugados de superfície, envolvidos nos mecanismos de embriogênese e citodiferenciação, como para o valioso efeito tampão das secreções salivares ao nível local e na cavidade amniótica, atuando frente às diferentes substâncias produzidas na etapa fetal pelos sistemas urinário e digestivo em desenvolvimento (Ferraris *et al.*, 2006).

Os ramos das glândulas salivares terminam em ácinos produtores de saliva. Esses ácinos podem ser serosos ou mucosos, definidos pela consistência da sua secreção, que podem ser aquosa ou viscosa, respectivamente. Células acinares mucosas secretam mucinas, que são grandes glicoproteínas com cadeias de carboidratos. Em geral, as mucinas são carregadas negativamente, o que contribui para a viscosidade da saliva. Células acinares serosas secretam uma grande quantidade de proteínas, tais como a amilase, entretanto não produzem mucinas. Por outro lado, alguns ácinos são denominados seromucosos e produzem tanto mucinas quanto proteínas serosas (Tucker, 2007).

A morfogênese da ramificação das glândulas salivares envolve células de crescimento coordenadas, proliferação, diferenciação, migração, apoptose e a interação de células epiteliais, mesenquimais, endoteliais e neurais com a matriz extracelular, proteases e fatores de crescimento. O epitélio de ramificação contém ductos indiferenciados e brotos em diferenciação final, enquanto o mesênquima contém células endoteliais e neurais em desenvolvimento. A interação das células endoteliais e neurais no desenvolvimento das glândulas ainda é desconhecida, assim como a função das células tronco salivares. A forma como o epitélio inicial toma as decisões de diferenciação e linhagem e como as moléculas regulatórias controlam a diferenciação, migração e formação do lúmen ainda permanecem desconhecidas (Patel *et al.*, 2006).

Ao final do processo de maturação, as glândulas salivares devem estar prontas para a produção de saliva, que ocorre em duas fases: uma fase acinar da produção da saliva primária e uma fase ductal de reabsorção de eletrólitos, resultando na saliva hipotônica. Esse processo depende de moléculas e troca de

íons, que são transportados ativamente ou passivamente através das membranas celulares das unidades ductais e acinares das glândulas salivares. O processo também depende da manutenção da adesão e polarização das células formadoras das glândulas (Lourengo *et al.*, 2007).

Além das glândulas pequenas dispersas pela cavidade oral, existem três pares de glândulas salivares maiores: as glândulas parótida, submandibular e sublingual (Junqueira & Carneiro, 2004).

### **2.1.1 - Glândula Parótida**

A glândula parótida é uma glândula 100% serosa, contendo grânulos de secreção ricos em proteínas e elevada atividade de amilase (Dale, 2001; Junqueira & Carneiro, 2004).

Durante a vida embriológica, a parótida é a primeira das três principais glândulas a se desenvolver e inicia sua formação na sexta semana de vida intra-uterina (VIU) (Martinez-Madrigal *et al.*, 2007).

Por volta da sétima semana de VIU, a glândula primitiva se move em direção dorsal e lateral, alcançando a região pré-auricular. O desenvolvimento do nervo facial, por volta da décima semana de VIU divide a glândula em porções superficial e profunda. Até o terceiro mês de VIU, a glândula atinge o seu padrão geral de organização. As estruturas epiteliais estão arranjadas em lóbulos, limitados por uma cápsula de tecido conjuntivo frouxo. O mesênquima é então colonizado por numerosos linfócitos, que são posteriormente transferidos para os linfonodos intraglandulares e extraglandulares. Ao sexto mês, os cordões epiteliais são canalizados e apresentam uma cobertura de células duplas ciliadas. A diferenciação celular começa nos ductos excretorios com a transformação progressiva das células ciliadas em células colunares, escamosas, e caliciformes. Os ductos intralobulares e a diferenciação acinar começam por volta do oitavo mês e a diferenciação das células mioepiteliais ocorre entre a décima nona e vigésima quarta semana de VIU. Entre 25 e 32 semanas, as células mioepiteliais

se “achata” e mostram prolongamentos citoplasmáticos. A produção de saliva começa como um líquido mucinoso neste momento, entretanto a maturação plena só é concluída após o nascimento (Martinez-Madrigal *et al.*, 2007).

Utilizando a parótida de ratos como modelo, o desenvolvimento cronológico das proteínas secretadas pela parótida foi primeiramente descrito pelos níveis de atividade catalítica de diversas enzimas digestivas. O aumento da atividade enzimática inicia somente após o nascimento, os grânulos secretores demonstram atividade enzimática a partir da primeira semana de vida. A peroxidase secretora, DNase e amilase demonstraram baixos níveis nas duas primeiras semanas de vida, tendo um aumento na terceira semana, entretanto a proteína secretora da parótida (PSP) demonstra um aumento linear da expressão nas duas primeiras semanas de vida, apresentando uma maior expressão que a amilase no mesmo período. (Redman & Field, 1993; Denny *et al.*, 1997; Ball *et al.*, 2003).

### **2.1.2 - Glândula Submandibular**

A glândula submandibular é uma glândula tubuloacínosa composta, sua porção secretora possui tanto células serosas quanto células mucosas. As células serosas são o principal componente dessa glândula, correspondendo por 90% das terminações secretoras da glândula submandibular, enquanto 10% consistem em túbulos mucosos com semiluas serosas (Dale, 2001; Junqueira & Carneiro, 2004).

Os primórdios das glândulas submandibulares aparecem ao final da sexta semana e, ao contrário da parótida, são provavelmente derivados do endoderma. O broto epitelial aparece no sulco entre a mandíbula e língua, ao lado do plano médio. A extensão do tecido glandular no mesênquima movimenta-se para trás e abaixo da mandíbula. A maturação e diferenciação celular são semelhantes ao da glândula parótida, exceto para o tecido linfóide, que é menos freqüente do que na parótida, além de não haver formação de linfonodos dentro da glândula (Martinez-Madrigal *et al.*, 2007).



A glândula submandibular é finamente encapsulada, encontrando-se dentro do triângulo submandibular, uma cavidade osteofibrosa a partir da qual ela assume a forma de um prisma triangular. Esta glândula está organizada em lóbulos conectados a um ducto excretor principal chamado de ducto de Wharton que mede cinco centímetros de comprimento e dois a três milímetros de diâmetro. O ducto circula entre os músculos milohioideo, hipoglosso e genioglosso, exteriorizando-se através de um orifício estreito em uma papila chamada carúncula sublingual localizada em cada lado do freio lingual (Martinez-Madrigal *et al.*, 2007).

### **2.1.3 - Glândula Sublingual**

A glândula sublingual, assim como a submandibular, é uma glândula tubuloacínosa composta, formada por células serosas e mucosas. As células mucosas predominam nessa glândula, enquanto que as células serosas apresentam-se exclusivamente constituindo semiluas serosas na extremidade de túbulos mucosos (Dale, 2001; Junqueira & Carneiro, 2004).

A glândula sublingual é a última das três grandes glândulas salivares a aparecer na VIU. Seus primórdios situam-se lateralmente à glândula submandibular para a glândula sublingual maior e no sulco linguo-gengival para as glândulas sublinguais menores. Os brotos epiteliais crescem para baixo do sulco, entre a mandíbula e a língua. A organização parenquimatosa e diferenciação da glândula sublingual são semelhantes aos da glândula submandibular, assim como a sua derivação endodérmica. A principal glândula sublingual pesa três gramas. Encontra-se na fossa sublingual da mandíbula e é cercada por tecido conjuntivo frouxo. Sua secreção é drenada através de um ducto principal (ducto de Bartholin) que se abre no ducto submandibular e em vários pequenos ductos (ducto de Rivinus) que se abrem separadamente na boca, no rebordo sublingual ou junto ao ducto submandibular (Martinez-Madrigal *et al.*, 2007).

## **2.1.4 - Glândulas Salivares Menores**

As glândulas salivares menores (linguais, bucais e palatinas) são pequenas glândulas mucosas que apresentam ductos curtos e produzem uma secreção principalmente rica em mucoproteínas com alta concentração de IgA secretora. Em humanos, as glândulas salivares menores secretam 10% do volume total de saliva, mas são responsáveis por aproximadamente 70% do muco que é secretado (Dale, 2001; Junqueira & Carneiro, 2004).

Numerosas glândulas salivares menores se localizam na região submucosa da cavidade oral, nariz e seio paranasal, podendo estar presente nas tonsilas palatinas e parafaringeanas. Essas glândulas produzem secreções similares às das glândulas salivares maiores, sendo excretadas por meio de pequenos canais presentes na superfície mucosa. A atividade secretora dessas glândulas parece ser contínua, entretanto elas podem responder a estímulos específicos locais químicos e físicos (Balogh & Pantanowitz, 2007).

Estruturalmente as glândulas salivares menores são compostas por glândulas tubulares ou tubuloacinares. Suas porções secretoras são os ácinos, que são designados de acordo com o seu tipo de secreção, podendo ser serosa, mucosa ou mista. Nos ácinos mistos, as células mucosas aparecem mais próximas do ducto excretor, enquanto que as células serosas aparecem como o fundo de saco do ácino e apresentam um formato de “meia lua”, recebendo o nome de semiluas de Giannuzzi (Balogh & Pantanowitz, 2007).

Com exceção das glândulas salivares palatinas, que aparecem a partir da 12ª semana de VIU, as glândulas salivares menores aparecem entre a oitava e décima semana de VIU nas diferentes localizações topográficas que mais tarde irão ocupar a cavidade bucal. Os principais locais de desenvolvimento das glândulas salivares menores são a região labial, palatina e lingual (Ferraris *et al.*, 2006).

### **2.1.4.1- Glândula Salivar Labial**

Seu desenvolvimento embriológico se inicia entre oito e dez semanas de VIU. Na 14<sup>a</sup> semana, os ácinos se encontram em diferentes estágios de diferenciação e os condutos excretores podem exibir uma luz evidente e conter material secretor PAS positivo, cianófilo e metacromático. Na 24<sup>a</sup> semana, se identificam citoquimicamente ácinos mucosos e seromucosos com conteúdo de mucina (Ferraris *et al.*, 2006).

#### **2.1.4.2- Glândula Salivar Palatina**

O desenvolvimento das glândulas palatinas se inicia entre a 12<sup>a</sup> e 14<sup>a</sup> semanas, após a completa fusão do palato secundário, quando aparecem cordões epiteliais sólidos na mucosa palatina, que crescem e se ramificam. Algumas dessas formações exibem grânulos cianófilos e PAS positivo em seus extremos distais. A membrana basal aparece aumentada em alguns pontos e uma luz central começa a se estabelecer de forma progressiva nos condutos. Na 18<sup>a</sup> semana, se distinguem claramente ácinos mucosos e uma quantidade escassa de ácinos serosos. Nas semanas seguintes, o sistema ductal destas glândulas se diferencia notoriamente, distinguindo-se na parede dos condutos glandulares menores, células metacromáticas entremeadas por células secretoras típicas. A partir da 24<sup>a</sup> semana, o parênquima glandular aparece estruturalmente bem diferenciado, com amplo predomínio de ácinos mucosos cuja secreção é fortemente PAS positiva, cianófila e levemente metacromática, sugerindo que esses ácinos produzem um conjunto heterogêneo de mucossubstâncias, com predomínio de sulfomucinas e glicoproteínas (Ferraris *et al.*, 2006).

#### **2.1.4.3- Glândula Salivar Lingual**

As glândulas linguais iniciam sua formação entre oito e dez semanas de VIU. Desde a oitava semana aparecem no mesênquima da ponta da língua e em

suas bordas látero-posteriores, acúmulos celulares e túbulos com luzes pouco visíveis. Entre 16 e 20 semanas é possível observar ácinos e condutos em formação cujas células apresentam grânulos PAS positivos. Na 20ª semana identificam-se ácinos mucosos, seromucosos e mistos na região correspondentes as glândulas de Blandin & Nuhn e ácinos mucosos na região das glândulas de Weber (Ferraris *et al.*, 2006).

### **2.1.5 - Palato**

O palato primário se desenvolve entre a quinta e sexta semana de VIU, enquanto o secundário se forma entre a sétima e oitava semana, a partir da face interna dos processos maxilares. A fusão de ambos os palatos ocorre entre a 10ª e 11ª semana de VIU (Ferraris & Muñoz, 2006).

O desenvolvimento do palato primário inicia com o desenvolvimento do segmento intermaxilar. Esta estrutura é derivada da fusão das proeminências maxilares com as proeminências nasais mediais. O segmento intermaxilar é constituído de um componente labial, que forma o filtro do lábio superior; um componente maxilar superior, que porta os quatro dentes incisivos; e um componente ósseo palatino, que forma o palato primário triangular (pré-maxila), separado do resto da maxila do período embrionário até o início do período fetal (Ferraris & Muñoz, 2006; Bender, 2000).

Embora o palato primário derive-se do segmento intermaxilar, a maior parte do palato definitivo (palato duro e mole) é formada pelo palato secundário que são duas extensões internas das proeminências maxilares em forma de prateleira. Estas extensões internas, as prateleiras palatinas, aparecem na sexta semana do desenvolvimento e dirigem-se obliquamente para baixo de cada lado da língua (Bender, 2000; Sadler, 2005).

Na sétima semana, porém, as prateleiras palatinas sobem, adquirem uma posição horizontal acima da língua. Neste momento, há morte programada de células da extremidade mesial que afinam o epitélio, permitindo a fusão das

prateleiras entre si ao longo da linha média, formando o palato secundário. Anteriormente, as prateleiras fundem-se ao palato primário. Dessa forma, todo o palato é gerado, deixando como prova dessa união um vestígio embrionário denominado de forame incisivo. A fusão do palato duro é finalizada na décima segunda semana (Bender, 2000).

### **2.1.6 – Língua**

O órgão lingual se desenvolve a partir do primeiro, segundo, terceiro e quarto arco branquial. Na quinta semana de VIU, pela face interna dos arcos mandibulares observam-se dois crescimentos laterais chamados protuberâncias linguais laterais e entre elas um pequeno tubérculo ímpar e medial. Estes três aumentos se originam do primeiro arco. Por trás do tubérculo ímpar existe outra elevação medial, de maior tamanho, chamada cópula, que resulta da união do mesenquima do segundo, terceiro e parte do quarto arco. De ambos os lados da cópula ocorre uma rápida proliferação no tecido adjacente ao segundo, terceiro e quarto arco branquial, que dará lugar à raiz da língua. Por último existe um terceiro crescimento medial que deriva da porção posterior do quarto arco e que indica o desenvolvimento da epiglote (Ferraris & Muñoz, 2006).

Na linha média, entre o tubérculo ímpar e a cópula, se forma a glândula tireóide primitiva como um divertículo epitelial dentro do assoalho da faringe. Este divertículo se separa da mucosa que lhe da origem e imigra em direção caudal. O ponto de invaginação permanece como uma fosseta chamada de forame cego, localizado no vértice do V lingual. É o ponto de referência localizado embriologicamente entre o tubérculo ímpar e a cópula, que assinala no adulto o limite entre o primeiro e o segundo arco branquial do embrião. Por esta razão, a parte dorsal e anterior da língua que deriva do primeiro arco é revestida por epitélio ectodérmico (assim como toda a mucosa bucal) enquanto a raiz da língua, situada por trás do V lingual, é revestida por epitélio endodérmico (Ferraris & Muñoz, 2006).

As papilas linguais aparecem ao final da oitava semana. As papilas circunvaladas e foliáceas aparecem primeiro, próximo aos ramos terminais do nervo glossofaríngeo. As papilas fungiformes aparecem mais tarde, junto das terminações do ramo da corda do tímpano do nervo facial. As papilas linguais mais comuns, as papilas filiformes, se desenvolvem durante o período fetal inicial (10 a 11 semanas de VIU) e contêm terminações nervosas aferentes sensíveis ao tato. Os corpúsculos gustativos se desenvolvem durante a 11<sup>a</sup> e 13<sup>a</sup> semanas por interação indutiva entre as células epiteliais da língua e as células nervosas gustativas do nervo da corda do tímpano, do glossofaríngeo e do vago. A maioria dos corpúsculos gustativos se forma na superfície dorsal da língua, e alguns se desenvolvem nos arcos palatoglossos, no palato, na superfície posterior da epiglote e na parede posterior da orofaringe (Moore & Persaud, 2004).

O mesênquima dos arcos faríngeos forma o tecido conjuntivo e os vasos da língua. A maior parte dos músculos da língua deriva dos mioblastos que migram dos miótomos occipitais. O nervo hipoglosso acompanha os mioblastos durante sua migração e inerva os músculos da língua à medida que estes se desenvolvem. A língua está completamente dentro da boca ao nascimento, entretanto, até os quatro anos de idade, seu terço posterior desce para a orofaringe (Moore & Persaud, 2004).

## **2.2 - Sistema Imune Inato**

A imunidade inata consiste de mecanismos pré-existentes à infecção (Janeway & Medzhitov, 2002), que são capazes de rápidas respostas frente ao agente agressor e que reagem essencialmente do mesmo modo as infecções repetidas. A resposta imune inata tem uma especificidade única para os produtos microbianos que, sob vários aspectos, diferem da especificidade do sistema imune adquirido. Sendo assim, tanto as respostas da imunidade inata e adquirida são componentes de um sistema integrado de defesa do hospedeiro, no qual numerosas células e moléculas funcionam cooperativamente (Abbas *et al.*, 2002).

Os principais componentes da imunidade inata são: barreiras físicas e químicas, tais como os epitélios e as substâncias antimicrobianas produzidas nas superfícies epiteliais, células fagocíticas (neutrófilos e macrófagos) e células natural killer (NK), proteínas do sangue, incluindo membros do sistema complemento e outros mediadores da inflamação e citocinas que regulam e coordenam muitas atividades celulares na imunidade inata (Abbas, 2005).

As superfícies epiteliais íntegras formam barreiras físicas entre micróbios externos e a defesa do hospedeiro. A perda da integridade desses epitélios predispõe a infecção. Assim a pele, superfícies mucosas do trato gastrointestinal e trato respiratório são protegidos pelo epitélio contíguo que impede a entrada de microorganismos. Os epitélios produzem peptídeos, os quais possuem uma propriedade antibiótica natural. Os mais bem conhecidos desses peptídeos são as defensinas que são abundantes nos grânulos dos neutrófilos. Já o epitélio do intestino secreta criptocidina, que através de mecanismos não muito conhecidos, são capazes de esterilizar localmente o lúmen dentro das criptas intestinais. As barreiras epiteliais possuem também linfócitos T intraepiteliais, linfócitos B e em alguns tipos de epitélio, uma população de mastócitos podem estar presente, os quais secretam substâncias que estimulam a inflamação (Abbas *et al.*, 2002).

Como parte do sistema imune inato tem-se os fagócitos que incluem os neutrófilos e macrófagos, os quais têm como principais funções ingerir e destruir micróbios invasores. Os neutrófilos e macrófagos reconhecem os micróbios através de diversos receptores que funcionam para estimular a migração das células para o sítio da infecção, promover fagocitose desse agente agressor e estimular a produção de substância microbicida. Os diferentes receptores apresentam funções distintas, mas que se sobrepõem. Os receptores transmembrana de sete  $\alpha$ -hélices dos fagócitos reconhecem os produtos microbianos e alguns mediadores que são produzidos em resposta à inflamação, e esses receptores transmembrana funcionam principalmente para estimular a migração de leucócitos para o sítio de infecção. Os macrófagos usam alguns

receptores pra se ligar diretamente aos micróbios e fagocitá-los, sendo assim, o receptor de manose que é uma lectina, se liga a resíduos terminais da manose e frutose das glicoproteínas e glicolípídeos que fazem parte das paredes de micróbios. Os macrófagos expressam também receptores para as porções Fc dos anticorpos IgG que podem revestir os micróbios, promovendo a fagocitose. Essa eficiência pode ser aumentada se esses micróbios estiverem revestidos por macromoléculas chamadas de opsoninas, que podem ser reconhecidas pelo sistema de receptores dos macrófagos (Abbas *et al.*, 2002).

Os lipopolissacarídeos (LPS) são produtos de bactéria gram-negativa que contém componentes lipídicos e polissacarídeos, ligam-se ao receptor dos macrófagos e estimulam a atividade microbida dessas células e a secreção de citocinas. O sistema do macrófago sensível ao LPS consiste em três componentes: uma proteína plasmática chamada proteína de ligação aos LPS (LPB), um receptor de superfície para LPS chamado CD14 e uma subunidade receptora de transdução de sinais de mamíferos chamado receptor 4 de proteína semelhante ao Toll. O LPS circulante é inicialmente ligado ao LPB e depois liberado para CD14 na superfície do macrófago onde LPB é liberado. A subsequente ativação dos macrófagos é resultado de sinais desencadeados pela subunidade semelhante ao Toll, que compartilham homologia estrutural e via transdução de sinais com o receptor da interleucina tipo 1 (IL-1) (Abbas *et al.*, 2002). O reconhecimento precoce de produtos bacterianos é crítico para a sobrevivência humana. Os LPS que são constituintes das paredes de bactérias gram-negativas, ácidos lipoteicóico de bactérias gram-positivas e lipoarabinomananas de micobactérias, apresentam um intenso efeito crítico. Em sepse, muitos tipos celulares incluindo neutrófilos e macrófagos respondem a esses constituintes ativando potentes mediadores inflamatórios (Hoffmann *et al.*, 1999; Bingle & Craven, 2002).

Muitas moléculas associadas com a resposta inata interagem especificamente com a superfície bacteriana. Em humanos, duas proteínas são críticas na mediação de sinais às bactérias gram-negativas: são as proteínas



ligadoras aos lipopolissacarídeos (LBP) e proteína de aumento de permeabilidade bactericida (BPI). Essas duas proteínas são estruturalmente relacionadas e podem ser consideradas como tendo funções antagonistas. LPB aumenta a resposta celular para LPS, enquanto BPI diminui essa resposta (Bingle & Craven, 2002; Bingle & Craven, 2003). BPI é uma molécula de 55 kD presentes nos grânulos dos leucócitos, que apresenta toxicidade seletiva contra bactérias gram-negativas. É constituída por dois domínios distintos, onde um se liga as endotoxinas bacterianas e o outro tem função de opsonina (Hoffmann *et al.*, 1999; Wheeler *et al.*, 2003).

As células NK são uma subpopulação de linfócitos que lisam as células infectadas por vírus e secretam citocinas, principalmente o interferon gama (IFN- $\gamma$ ). O principal papel fisiológico dessas células é o de defesa contra infecção por vírus e alguns outros microrganismos intracelulares. O reconhecimento das células infectadas é regulado por uma combinação de receptores de ativação e de inibição. As moléculas de MHC são proteínas especializadas, responsáveis por exibir os antígenos dos micróbios ligados às células, para reconhecimento pelos linfócitos T. Existem dois tipos de moléculas do complexo de histocompatibilidade maior (MHC), o de classe I, presente em todas as células nucleadas de um indivíduo normal e o de classe II, normalmente expressa pelas células dendríticas, linfócitos B e poucos outros tipos celulares. Os receptores inibitórios reconhecem as moléculas de MHC de classe I, razão pelo qual as células NK não destroem as células normais do hospedeiro, porém matam as células nas quais a expressão de MHC classe I está reduzida, tal qual nas células infectadas por vírus. Sendo assim, as células NK são ativadas pelo reconhecimento de três tipos de células: células revestidas de anticorpos, células infectadas por vírus ou por algumas bactérias intracelulares e células com pouca expressão de moléculas de MHC. A ativação das células NK resulta no desencadeamento de funções efectoras de lise das células alvo e produção de citocinas (Abbas *et al.*, 2002).

O sistema complemento consiste de aproximadamente 20 proteínas plasmáticas que interligam o reconhecimento dos micróbios às funções efectoras e

ao desenvolvimento da inflamação. O reconhecimento de micróbios pelo sistema complemento na imunidade inata ocorre pela via alternativa, através do reconhecimento direto de certas estruturas de superfície microbiana. Isto resultará em recrutamento seqüencial e reunião de proteínas adicionais do complemento em complexos de proteases. Os produtos de degradação gerados pelas proteases ligam-se covalentemente aos micróbios, podendo servir como opsoninas e promovendo a fagocitose dos micróbios em cuja superfície o complemento é ativado. Outras proteínas circulantes da imunidade inata como, por exemplo, a lectina ligadora de manose e a proteína C reativa, revestem os micróbios para facilitar o reconhecimento pelo sistema complemento e fagocitose (Kumar *et al.*, 2005; Abbas *et al.*, 2002).

Diferentes citocinas do sistema imune inato, como por exemplo, fator de necrose tumoral (TNF), IL-1 e quimiocinas recrutam e ativam leucócitos, intensificando a atividade microbicida dos fagócitos e estimula as respostas das células NK e das células T. A reação local inicial da imunidade inata é a resposta inflamatória, na qual os leucócitos são recrutados para o sítio da infecção e ativados para erradicá-los, produzindo uma variedade de alterações sistêmicas no hospedeiro que acentuam a capacidade do sistema imune inato de erradicar a infecção. As moléculas produzidas durante as respostas imunes inatas estimulam e influenciam a natureza das respostas imunes adquiridas (Abbas *et al.*, 2002).

As superfícies mucosas da cavidade oral e trato aéreo superior são pontos de grande entrada de microrganismos envolvidos em doenças locais e sistêmicas (Geetha *et al.*, 2005). Uma variedade de proteínas e peptídeos antimicrobianos têm sido identificados na saliva e fluídos das vias aéreas superiores como beta-defensina em língua (Weinberg *et al.*, 1998), polipeptídeos catiônicos (Cole *et al.*, 2002), defensinas (Ganz *et al.*, 2003), lactoferrinas, lisosima, peroxidase salivares (Tenovou, 1998; Edgerton & Koshlikova, 2000) e inibidor da proteinase secretada por leucócitos (SLPI) (Rocha *et al.*, 2008). Essas proteínas têm função protetora na cavidade bucal e vias aéreas superiores.

A proteína SLPI é um inibidor da proteinase endógeno presente nas secreções mucosas. Rocha *et al.* (2008) avaliaram a presença de SLPI em glândulas submandibulares de pacientes HIV positivo. Os autores avaliaram 36 glândulas submandibulares de pacientes HIV positivo (10 com histologia normal, 10 com sialodenite crônica inespecífica, oito com micobacteriose e oito com citomegalovirose), além de 10 glândulas de pacientes HIV negativo (controle). Os resultados demonstraram que não houve diferença significativa na expressão de SLPI entre o grupo controle e o grupo com micobacteriose, sialodenite crônica inespecífica e com histologia normal. Entretanto, houve uma forte expressão de SLPI nas glândulas de pacientes HIV positivo com citomegalovirose, demonstrando que a infecção por citomegalovírus aumenta a expressão de SLPI em glândulas submandibulares de pacientes HIV positivo.

De acordo com Bradshaw (2003), a identificação de novas proteínas e peptídeos antimicrobianos é prioridade contínua. Proteína secretora da parótida (PSP) e PLUNC foram recentemente descobertas na cavidade oral e trato aéreo superior. Tanto o PSP quanto o PLUNC exibem semelhança com as proteínas de ligação como BPI e LBP (Bingle & Craven, 2002).

## **2.3 - PLUNC**

### **2.3.1 - Descrição de PLUNC**

Weston *et al.* (1999) tentando identificar genes com possíveis papéis na regulação do desenvolvimento facial, acabaram descobrindo um novo gene expresso pelo epitélio embriológico do palato e fossas nasais de ratos e no epitélio traqueobrônquico do pulmão de camundongos adultos. Esse gene codifica uma proteína de aproximadamente 300 kilobase (kb), denominada pelos autores de *PLUNC* (palate, lung and nasal epithelium clone). A função de *PLUNC* ainda é desconhecida, porém análises seqüenciais mostram que está relacionada com proteínas produzidas por glândulas endócrinas da traquéia e por glândulas

salivares, como a proteína secretora da parótida (PSP) e a proteína B da glândula submandibular (SBGB) (Weston *et al.*, 1999; LeClair *et al.*, 2001).

Bingle & Bingle (2000) caracterizaram o gene *PLUNC* humano que contém 1020 pares de base (pb), está localizado no cromossomo 20q11 e contém 9 éxons com aproximadamente 7.3 kb. O primeiro (menor) e o nono éxons não são traduzidos. Uma suposta TATAbox está localizada a 40 pb do fim do primeiro éxon. Os éxons variam de tamanho entre 40 a 174 pb, enquanto que os íntrons variam entre 1642 e 159 pb. Um longo íntron separa o primeiro e o segundo éxon.

Vários estudos demonstraram homologia de *PLUNC* em células de epitélio normal da cavidade nasal e vias aéreas superiores de ratos, bovinos, suínos, camundongo e humanos (Bingle & Bingle, 2000; LeClair *et al.*, 2001; Sung *et al.*, 2002; LeClair, 2003; Larsen *et al.*, 2005) sugerindo que *PLUNC* pode ser conservada entre as espécies e apresenta suposta função bactericida. LeClair *et al.* (2004) caracterizaram, em camundongos, a sequência genômica de *SPLUNC5*, que apresentou 60% de homologia com *SPLUNC1*. No entanto, notou-se que *SPLUNC5* é expresso exclusivamente no epitélio intrapapilar da superfície dorsal da língua. Esse padrão de expressão é consistente com a hipótese de que essas proteínas protegem as superfícies epiteliais colonizadas por microrganismos potencialmente patogênicos. De acordo com Bingle & Craven (2003), há aproximadamente 45-76% de homologia entre os genes de *PLUNC* humano e de camundongo.

### **2.3.2 – Membros da família PLUNC**

A família *PLUNC* é constituída por sete proteínas que se dividem em dois grupos: um grupo designado como proteínas curtas (short), contendo oito ou nove éxons, compreendendo a *SPLUNC1* (256 aminoácidos), *SPLUNC2* (249 aminoácidos) e *SPLUNC3* (253 aminoácidos); e outro grupo designado como proteínas longas (long), contendo quinze ou dezesseis éxons, compreendendo *LPLUNC1* (484 aminoácidos), *LPLUNC2* (458 aminoácidos),

LPLUNC3 (463 aminoácidos) e LPLUNC4(> 469 aminoácidos) (Bingle & Bingle, 2000; Bingle & Craven, 2002; LeCleir, 2003).

Bingle & Craven (2003) afirmaram que a família de proteínas PLUNC é formada por quatro genes curtos e por seis genes longos. *LPLUNC5* não está totalmente identificado, sendo sugerido que ele possa ser um pseudo gene. Dois *LPUNC* foram recentemente descritos como *BPIL1* e *BPIL3*. Um gene *SPLUNC* tem recebido a designação de *BASE* (breast cancer and salivary expressed). Esse gene parece ter organização genômica semelhantes a outros genes *SPLUNCs*, porém *BASE* parece ter uma modificação entre a junção do sexto e sétimo éxons, resultando na perda de cisteína, sugerindo uma modificação genética recente (Figura 1).

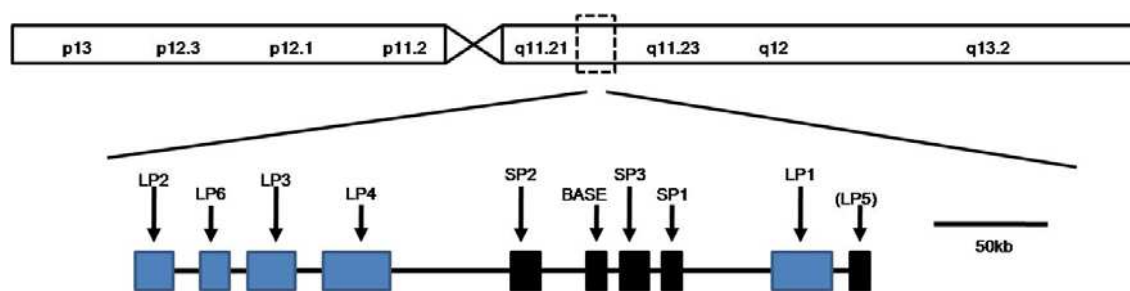


Figura 1: O locus gênico completo do PLUNC humano está contido dentro de 300kb no cromossomo 22q11.2. As caixas representam os genes *PLUNC* “long” (LP) e “short” (SP). A barra de tamanho representa 50 kb.

### 2.3.3 – Funções de PLUNC

A função de PLUNC ainda é incerta, porém devido à superexpressão de PLUNC em epitélios expostos a injúrias, pode ser sugerido que essas proteínas são secretadas como produtos com papel defensivo ou protetor (Bingle & Craven, 2003).

LeClair (2003) propõe algumas hipóteses para a função da família PLUNC na imunidade inata do epitélio oral. Segundo o autor, as proteínas da família PLUNC, assim como outras moléculas similares da imunidade inata (BPI,

LBP, CD14), presentes na mucosa oral, possuem potenciais receptores de LPS. O autor sugere que as proteínas LPLUNC podem atuar de modo similar a LBP, tendo uma função pró-inflamatória apresentando moléculas microbianas à via CD14/receptores toll like (TLR) 2 ou TLR-4, envolvendo outras vias de TLRs ou ainda sinalizando outras vias desconhecidas. Em contrapartida, a SPLUNC agiria de forma similar a BPI, tendo uma função antiinflamatória, diminuindo a carga microbiana da superfície oral através da morte celular direta ou do seqüestro de moléculas inflamatórias.

Bingle *et al.* (2004) analisaram os genomas de humanos, ratos e camundongos buscando relações entre a família de proteínas PLUNC de humanos e outras espécies e ainda entre estas proteínas e os membros da família BPI. Segundo os autores as proteínas da família PLUNC parecem estar restritas aos vertebrados, enquanto a família BPI contém proteínas presentes em invertebrados e plantas. As proteínas SPLUNC apresentam homologia com o domínio N-terminal da proteína BPI, enquanto que as proteínas LPLUNC apresentam homologia com os domínios N-terminal e C-terminal do BPI. Os autores mostraram que a família PLUNC de camundongos e humanos é ortóloga e evolui rapidamente, o que corrobora a hipótese de que estas proteínas estão envolvidas na defesa do hospedeiro. Intrigantemente, essa rápida evolução entre as seqüências de humanos e ratos é substituída por uma intensa seleção purificadora em uma porção do domínio N-terminal de LPLUNC4. Em comparação com proteínas parálogas, as proteínas LPLUNC, têm o tamanho do segundo éxon de codificação (exon 3) muito mais variável do que o tamanho dos outros éxons, e a LPLUNC4 possui um éxon extra (exon 3-B), que codifica aproximadamente 150 resíduos inseridos nesse local. O éxon 3 codifica a seqüência correspondente ao 40s “grampo para cabelo” do BPI. A variabilidade dessa região pode ser crucial para as diferenças de especificidade entre os membros da família PLUNC.

Bingle & Gorr (2004) sugeriram um modelo para a função de PLUNC na inflamação. Segundo os autores, as proteínas PLUNC podem agir na defesa do hospedeiro como proteínas antiinflamatórias, inibindo a ação inicial da LPS na

cascata inflamatória. SPLUNC1 pode se ligar diretamente ao LPS e, além disso, peptídeos derivados da sequência PSP podem inibir a indução de LPS estimulado pelo fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) secretado por macrófagos e bloquear a ligação de LPS com LBP. Entretanto, a proteína PLUNC purificada não bloqueou a ligação de LPS com LBP (Campos *et al.*, 2004) sugerindo que diferenças na atividade biológica existem entre diferentes proteínas PLUNC ou que o processamento proteolítico é necessário para a completa atividade biológica. Desta forma, os autores sugerem que, LPS estimula a secreção de citocinas pró-inflamatórias e da matriz metaloproteinase MMP-9 (importante na inflamação, clivando componentes da membrana basal, permitindo que linfócitos e leucócitos entrem ou saiam da circulação sanguínea e linfática), e além de TNF $\alpha$  de macrófagos (responsável pelo recrutamento dos leucócitos para o sítio de infecção). As proteínas PLUNC secretadas nas vias aéreas ou nas células epiteliais da glândula salivar podem modular a ação do LPS. A atividade e os níveis da proteína PLUNC também são reguladas pela MMP-9, que cliva as moléculas de PLUNC. A existência de múltiplas proteínas dentro da família PLUNC, segundo os autores, sugere que as diferentes proteínas podem ser eficazes contra patógenos específicos e/ou suas moléculas de LPS ou mediadores lipídicos.

#### **2.3.4 – Expressão da proteína PLUNC**

LeClair *et al.* (2001) avaliaram, através de reação em cadeia de polimerase por transcriptase reversa (RT-PCR), a expressão da proteína PLUNC em ratos adultos, recém nascidos e no período embrionário (12.5, 13.5, 14.5, 16.5, 17.5, 18.5 e 19 dias de gestação). Os resultados mostraram que a expressão da proteína PLUNC no epitélio nasofaríngeo ocorreu a partir de 14,5 dias de gestação, se mantendo nos estágios posteriores avaliados e persistindo na vida adulta. No pulmão, a expressão de PLUNC pode ser observada fracamente a partir do décimo sexto dia de gestação, aumentando gradativamente até sua

máxima expressão no pulmão de ratos adultos. A expressão de PLUNC no timo ocorreu de forma inversa, sua máxima expressão foi visualizada no décimo quinto dia gestacional, decrescendo constantemente a partir desse ponto. Desta forma, os autores sugerem que a expressão da proteína PLUNC no timo, que também abriga produtos gênicos antimicrobianos, pode ser um peptídeo antimicrobiano semelhante ao PSP, justificando novos estudos para identificar o papel da proteína PLUNC na fisiologia do pulmão de jovens e adultos.

Sung *et al.* (2002) relataram que variações no nível de expressão da proteína PLUNC podem estar correlacionadas com diferenças na suscetibilidade para infecções. Os autores avaliaram a expressão da proteína PLUNC em ratos após a lesão do bulbo olfatório (bulbectomia). O aumento da regulação da proteína PLUNC no epitélio respiratório, pós-bulbectomia, foi confirmado por Northern blot e por hibridização *in situ*, sugerindo que a proteína PLUNC em ratos possui função bactericida e bacteriostática e podem fornecer proteção contra infecções subsequente à lesão.

Na análise da seqüência do genoma humano, um gene (C20orf70) que está relacionado com a PSP de roedores e bovinos foi identificado no cromossomo 20q11. Esta região corresponde ao cromossomo 2 do rato, a localização do gene PSP do rato. O produto do gene C20orf70, SPLUNC2 ou PSP, é expresso na saliva e nas glândulas parótidas, submandibulares, além de pertencer a uma família de proteínas epiteliais secretoras da via oral e respiratória, incluindo BSP30, proteína B da glândula submandibular (SBGB), proteína das glândulas salivares menores de von Ebner e várias espécies de PLUNC, proteínas X específicas do pulmão (LUNX) e proteína de secreção do trato respiratório superior (SPURT) (Geetha *et al.*, 2003; Bingle & Gorr, 2004).

Geetha *et al.* (2003) avaliaram a expressão e a atividade anti-bacteriana da PSP em humanos. Utilizando a técnica do PCR, o cDNA para o PSP humano foi amplificado de uma amostra de cDNA de parótida humana, e a amilase humana foi amplificada como controle. O nível de expressão da PSP foi semelhante ao da amilase, que é a proteína mais comum secretada na glândula



parótida. A microscopia de imunofluorescência mostrou expressão de PSP nas células epiteliais do ducto e células acinares. Uma proteína parecida com PSP foi isolada através da cromatografia por imunoafinidade da saliva e os autores também puderam comprovar o efeito bactericida e bacteriostático da PSP em colônias de *Pseudomonas aeruginosa*. Segundo os autores, os peptídeos derivados de PSP inibem a ligação de endotoxinas para o LBP e inibem a secreção de estimulantes de endotoxinas do TNF $\alpha$  dos macrófagos. Os resultados sugerem que a PSP é uma proteína antibacteriana e antiinflamatória da cavidade oral com função semelhante à BPI sendo expressa nas glândulas parótidas e saliva humana.

Outros autores posteriormente testaram esse possível papel da proteína PSP na imunidade inata. Gorr *et al.* (2008), verificaram que o peptídeo GL-13 da proteína PSP induz um entrelaçamento das bactérias, ocasionando uma aglutinação passiva das bactérias *Pseudomonas aeruginosa* Gram negativas, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Streptococcus gordonii* Gram positivas. A aglutinação bacteriana apresentou-se tempo/dose dependente e envolveu interações hidrofóbicas. O peptídeo GL-13 inibiu a adesão das bactérias às superfícies plásticas e a aglutinação induziu o aumento da fagocitose de *P. aeruginosa* por macrófagos. Estes resultados sugeriram que o peptídeo GL-13 representa uma classe de peptídeos antimicrobianos, que não matam diretamente as bactérias mas reduzem a adesão bacteriana e promovem a aglutinação, levando ao aumento da eficácia das células fagocíticas. Novamente, Geetha *et al.* (2005) avaliaram a atividade antimicrobiana da proteína PSP. Nesse trabalho, os autores projetaram três peptídeos catiônicos (GK-7, KK-9, KN-11), com base na estrutura da PSP e em regiões ativas conhecidas do BPI. Esses peptídeos inibiram a ligação do LPS estimulador da secreção de TNF $\alpha$  dos macrófagos e inibiram diretamente a ligação do LPS com a LBP. Esses resultados, segundo os autores, sugerem que esses peptídeos de PSP podem ser utilizados como modelo para pesquisas de peptídeos antiinflamatórios.

Wheeler *et al.* (2003) consideraram que os membros do família semelhante ao BPI, parecem ter um padrão distinto de expressão nos tecidos. Por exemplo, o BPI é encontrado nos grânulos secretórios dos leucócitos; a LBP, a proteína de transferência de fosfolípídeo (PTF) e a proteína de transferência de éster de colesterol (PTEC) são proteínas plasmáticas produzidas predominantemente pelo fígado; o PSP (SPLUNC2) é expresso nas glândulas salivares e LUNX (SPLUNC1) é expresso no epitélio das vias aéreas. No entanto, os padrões de expressão de vários membros dessa família de genes, incluindo as proteínas da glândula salivar menor de von Ebner, também chamada de LPLUNC1, a RY2G5 (LPLUNC4), a RYA2 (LPLUNC3), a proteína X (SPLUNC3), a proteína Y (BPIL3) e proteína Z (LPLUNC2 ou BPIL1), não foram muito bem caracterizados.

A proteína PLUNC foi identificada pela primeira vez na saliva humana por Vitorino *et al.* (2004) utilizando a técnica proteômica. Posteriormente outros autores (Guo *et al.*, 2006; Ramachandran *et al.*, 2006; Walz *et al.*, 2006) também identificaram PLUNC na saliva. Das proteínas avaliadas por Vitorino *et al.* (2004), 11 foram separadas e identificadas na saliva pela primeira vez utilizando as ferramentas proteômicas. Além disso, as proteínas PLUNC, cistatina A e cistatina B foram pioneiramente identificadas na saliva.

Ghafouri *et al.* (2003) avaliaram a quantidade de proteína PLUNC expressa no fluido nasal de indivíduos não fumantes (controle), fumantes, indivíduos expostos ao ácido anídrico orgânico e expostos a químicos epóxi reativos. Os resultados demonstraram que a exposição à irritantes do trato aéreo por um período prolongado leva a uma diminuição da proteína PLUNC no trato aéreo superior, possivelmente por um efeito tóxico nas células secretoras.

A expressão da proteína PLUNC foi observada no tecido glandular do trato respiratório e em outras glândulas mucosas por Bingle *et al.* (2005). Os autores avaliaram por meio de imunoistoquímica o padrão de expressão de SPLUNC1 em tecidos glandulares normais obtidos da região pulmonar, oral e nasal, assim como a expressão de SPLUNC1 em diferentes tipos de câncer de

pulmão, incluindo tecidos representativos de metástases à distância. Eles demonstraram que SPLUNC1 pode ser achado nas células mucosas, nos ductos e no conteúdo dos ductos das glândulas submucosas do trato aéreo superior normal, assim como em glândulas menores do nariz, seios paranasais, região posterior da língua e tonsila, suportando a sugestão de que SPLUNC1 possa desempenhar função na imunidade inata das vias aéreas, já que todas essas regiões produzem proteínas de defesa do hospedeiro. Os resultados também demonstraram uma forte expressão nos cânceres de pulmão de fenótipo glandular sugerindo que SPLUNC1 pode ser um importante marcador imunoistoquímico para essas lesões.

Shiba *et al.* (2005) descreveram a presença de PSP (SPLUNC2) nos queratinócitos gengivais humanos (QGH) cultivados primariamente. Os autores avaliaram a expressão de PSP quando exposto ao *P. gingivalis*, ao TNF $\alpha$  e ao 17 $\beta$ -estradiol. Os níveis de mRNA PSP foram examinados por PCR em tempo real e a expressão da proteína PSP foi confirmada por imunofluorescência. Os resultados obtidos através do PCR em tempo real, demonstraram um aumento dos níveis de mRNA PSP nos QGH expostos ao *P. gingivalis*, ao TNF $\alpha$  e ao 17 $\beta$ -estradiol. Além disso, notou-se o aumento da expressão intracitoplasmática da proteína PSP nos QGH expostos ao *P. gingivalis*. Segundo os autores, esses resultados mostraram que a proteína PSP dos QGH pode ser regulada por bactérias e fatores humorais, sugerindo que a proteína PSP possa desempenhar um papel na imunidade inata da superfície epitelial gengival.

Kim *et al.* (2006) avaliaram a localização e a regulação de PLUNC no epitélio nasal humano. Foram realizados exames imunoistoquímicos em amostras de cornetos nasais. A análise de Western Blot foi realizada em secreção nasal de voluntários saudáveis, secreção cultivada a partir do epitélio nasal humano, amostras da mucosa etmóide posterior de aparência normal, cornetos inferiores e pólipos nasais. Foi realizada RT-PCR de PLUNC com mRNA cultivados a partir de células do epitélio nasal humano tratados com interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) e TNF $\alpha$ . Os resultados obtidos pelos autores demonstraram que a proteína PLUNC foi

expressa na superfície de células ciliadas epiteliais, nas células serosas da glândula submucosa da mucosa nasal humana, além de terem sido encontradas na secreção nasal de voluntários saudáveis e secreção cultivada de células do epitélio nasal humano. Os autores também observaram que o grau de diferenciação mucociliar e mediadores pró-inflamatórios não influenciaram a expressão do gene e da proteína PLUNC no epitélio nasal.

Zhou *et al.* (2006) avaliaram a expressão do SPLUNC1 em quatro fetos humanos normais, com idade entre 28-30 semanas de gestação, utilizando métodos imunoistoquímicos e RT-PCR. Os autores avaliaram o trato respiratório superior, glândulas salivares, trato digestivo, olhos e tecido adiposo. Os ductos e as glândulas submucosas, assim como o epitélio escamoso e ciliado da região nasal, palatina, nasofaríngea e traqueal mostraram uma forte marcação positiva, com padrão citoplasmático, para SPLUNC1. A glândula parótida apresentou uma forte expressão imunoistoquímica de SPLUNC1 enquanto que a glândula submandibular apresentou uma marcação fraca. Outros tecidos como língua, lábio, linfonodo, músculo e septo nasal apresentaram marcação negativa. O estudo mostrou que a expressão de SPLUNC1 ocorre com maior intensidade em fetos humanos do que em adultos. Os autores indicam que a SPLUNC1 não está envolvida somente nos mecanismos de defesa do trato respiratório superior, olhos, e trato digestivo, mas provavelmente também esteja envolvido no desenvolvimento do feto e do metabolismo lipídico.

He *et al.* (2005) investigaram a possível associação entre o polimorfismo do gene PLUNC com a suscetibilidade ao carcinoma nasofaríngeo (CNF) na população chinesa. Foram analisados 239 pacientes com CNF e 286 controles. Os polimorfismos C2128T e C1888T apresentaram significativa associação com a suscetibilidade para CNF. Além disso, a distribuição dos haplótipos, baseados nos polimorfismos C2128T e C1888T, foram significativamente diferentes entre os pacientes com CNF e os controles, indicando que os indivíduos com o haplótipo CC têm um significativo aumento da suscetibilidade ao carcinoma nasofaríngeo. Desta forma, os autores concluíram

que a variação genética no gene PLUNC pode influenciar a suscetibilidade ao carcinoma nasofaríngeo na população chinesa.

Chu *et al.* (2007) determinaram as funções antiinflamatórias e de defesa da proteína SPLUNC1 na infecção respiratória por *Mycoplasma pneumoniae* (Mp) e a regulação de SPLUNC1 pelo Mp e na inflamação alérgica. As funções de SPLUNC1 foram examinadas na Mp e na cultura de células epiteliais das vias aéreas humana por proteína recombinante SPLUNC1, superexpressão e RNA de interferência. A expressão de SPLUNC1 no epitélio brônquico humano e de rato foi analisada por imunoistoquímica, Western blotting, ELISA, microdissecção por captura a laser e PCR em tempo real. Os modelos de ratos para infecção por Mp e inflamação alérgica e interface ar-líquido das culturas de células epiteliais brônquicas primárias normais de humanos foram usadas para estudar a regulação de SPLUNC1 por Mp e interleucina 13 (IL-13). Os resultados demonstraram que a proteína SPLUNC1 diminuiu os níveis do Mp e inibiu a produção epitelial de interleucina 8 (IL-8) induzida pelo Mp derivado de lipoproteínas; muitas células epiteliais respiratórias de humanos e ratos mostraram um alto nível de expressão de SPLUNC1; foi observado também que a infecção pelo Mp aumentou a expressão de SPLUNC1 e diminuiu a expressão de IL-13. Os resultados sugerem que a SPLUNC1 serve como uma proteína de defesa do hospedeiro contra o Mp e que uma reação alérgica pode reduzir acentuadamente a expressão de SPLUNC1, o que pode contribuir em parte para a natureza persistente das infecções bacterianas nas vias respiratórias.

Bingle *et al.* (2007) avaliaram as diferentes expressões da suposta molécula de imunidade inata, SPLUNC1, na fibrose cística (FC). Os autores usaram imunoistoquímica para localizar a proteína SPLUNC1 em amostras de pulmão de pacientes com fibrose cística e de outras doenças pulmonares. A amostra era formada por dez casos de fibrose cística, dez casos normais (controle), dez casos com enfisema pulmonar e dois com pneumonia. Foram utilizados vários marcadores para tipos celulares distintos para tentar estabelecer o exato local de secreção do SPLUNC1. Os estudos foram complementados com

a análise molecular da expressão gênica de SPLUNC1 em células primárias pulmonares de humanos e em colônias de células inflamatórias isoladas. Os resultados demonstraram que o epitélio das vias aéreas menores do pulmão com FC exibem uma expressão significativamente aumentada de SPLUNC1 em comparação com locais semelhantes em vias aéreas de pulmões sem FC. Culturas de células epiteliais traqueobronquiais primárias analisadas por RT-PCR mostraram que mediadores pró-inflamatórios não induzem a expressão de SPLUNC1 e que a expressão gênica de SPLUNC1 não pode ser vista isoladamente em células mononucleares, macrófagos e neutrófilos. Desta forma, os autores concluem que o SPLUNC1 é especificamente e significativamente aumentado nas vias aéreas menores de pulmões de pacientes com FC e sugerem que o epitélio das vias aéreas é responsável pelos altos níveis de SPLUNC1 e não as células inflamatórias, podendo ser uma resposta defensiva ao componente infeccioso da doença.

As proteínas LPLUNC1, SPLUNC1 e SPLUNC2 apresentam uma distribuição diferente nas glândulas salivares maiores normais. LPLUNC1 apresenta um padrão de marcação nas células ductais, não sendo evidente nas células mucosas e serosas. SPLUNC1 apresenta um padrão de marcação nos ácinos mucosos e dentro dos ductos, não sendo evidente nas células serosas. SPLUNC2 apresenta um alto padrão de marcação nas células serosas, no entanto não apresenta positividade nos ductos e células mucosas (Vargas *et al.*, 2008; Silva, 2009).

Vargas *et al.* (2008) determinaram a expressão da proteína PLUNC em tumores benignos e malignos de glândula salivar, avaliando seu potencial uso como ferramenta de diagnóstico e/ou prognóstico. Foram utilizados 64 cortes histológicos de glândulas salivares previamente diagnosticadas com uma variedade de tumores. Os dados clínicos e patológicos foram recolhidos e foi realizada a análise retrospectiva e imunoistoquímica de três proteínas PLUNC (SPLUNC1, SPLUNC2 e LPLUNC1). A imunorreatividade foi avaliada como positiva ou negativa. Os autores identificaram a expressão de PLUNC somente

nos carcinomas mucoepidermóide e cistoadenocarcinoma papilar, todos os outros tumores estudados foram negativos. Plugues de mucina, células mucosas e células intermediárias do carcinoma mucoepidermóide foram positivas para LPLUNC1 e SPLUNC2, mas áreas compostas de células claras e epidermóides foram negativas para todos os subtipos de PLUNC estudados. O cistoadenocarcinoma papilar foi positivo para todos os subtipos de PLUNC estudados. Segundo os autores, a expressão intensa de duas proteínas PLUNC em células mucosas e plugues de mucina no carcinoma mucoepidermóide e no cistoadenocarcinoma papilar indicam que elas poderiam ser úteis para realizar o diagnóstico diferencial com outros tumores de glândula salivar ou tumores metastáticos.

Silva (2009) analisou a resposta do sistema imune inato (proteínas da família PLUNC) em glândulas salivares maiores, provenientes de pacientes autopsiados com AIDS e sem AIDS (grupo controle), subdivididos em 05 grupos: grupo 01 controle (pacientes HIV negativos), grupo 02 (HIV+ sem alterações nas glândulas salivares maiores), grupo 03 (micobacteriose), grupo 04 (citomegalovirose) e grupo 05 (sialadenite), para a realização de reações de imunoistoquímica para os anticorpos SPLUNC1, SPLUNC2A, SPLUNC2B e LPLUNC1. Para o grupo controle também foi realizado a técnica de hibridização *in situ* para SPLUNC2. Nos casos de micobacteriose e citomegalovirose foi observada maior intensidade de marcação nas regiões próximas à área de infecção, quando comparada com áreas na periferia da lesão para os anticorpos SPLUNC2A e 2B. Com relação à hibridização *in situ*, foi observado positividade em todos os casos. Segundo a autora, os resultados sugerem que a família de proteínas PLUNC pode ter papel fundamental na proteção dos organismos frente a agentes infecciosos, no entanto são necessários outros estudos para confirmar estes achados.

Bartlett *et al.* (2008) foram os primeiros autores a apresentar indícios da presença da proteína PLUNC em células de linhagem hematopoiética. Utilizando a técnica da imunoblot os autores conseguiram demonstrar a presença de PLUNC

nos grânulos específicos dos neutrófilos que são secretados após a degranulação, indicando que a liberação de PLUNC pelos polimorfos nucleares atua na resposta do estímulo inflamatório. Estes resultados sugerem que a secreção da proteína PLUNC está fortemente vinculada à degranulação e é provável que seja uma característica geral da ativação neutrofílica em resposta a uma variedade de estímulos. Os autores também testaram a capacidade antibacteriana da PLUNC em bactérias como a *E. coli* DH5- $\alpha$ , *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 e na bactéria Gram positiva *Listeria monocytogenes*. Após a incubação destas bactérias com a proteína PLUNC, não houve qualquer efeito aparente sobre sobrevivência bacteriana. Esses resultados levaram os autores a concluir que a PLUNC por si só não é agente antimicrobiano eficaz contra este grupo de microorganismos, entretanto sua presença em células de defesa indica sua participação, mesmo que indireta, na resposta inflamatória.

Bingle *et al.* (2009) avaliaram e caracterizaram a expressão de SPLUNC2 nas glândulas salivares maiores de humanos. Os resultados do Western Blotting mostraram que os anticorpos identificaram uma série de bandas de proteína distintas na saliva. Ao mesmo tempo, a análise imunoistoquímica demonstrou a expressão de SPLUNC2 nas células serosas e lúmen ductal das glândulas salivares maiores, bem como em células mucosas de glândulas salivares menores. Os anticorpos SPLUNC2A e SPLUNC2B, dirigidos contra epítomos distintos de SPLUNC2 resultaram em padrões de marcação divergentes em glândulas salivares maiores e menores. Usando RT-PCR em tecidos da cavidade oral, os autores demonstraram que o gene sofre splicing alternativo utilizando dois éxons 5' não codificantes, sugerindo que o gene é regulado por promotores alternativos. A análise de saliva mostrou que SPLUNC 2 é sujeita a N-glicosilação. Assim, o estudo mostra que várias isoformas de SPLUNC2 são encontradas na cavidade oral e sugerem que essas proteínas podem ser diferencialmente reguladas em tecidos distintos e que podem ter papel na resposta imune inata.



O padrão de marcação imunoistoquímica em glândulas salivares de humanos adultos apresenta diferenças para os anticorpos SPLUNC2A, SPLUNC2B e SPLUNC1. Na glândula parótida, SPLUNC2 apresenta marcação positiva nas células serosas, entretanto SPLUNC2B apresenta uma marcação mais forte que SPLUNC2A. Nas células dos ductos intralobulares (intercalares e estriados), assim como o conteúdo luminal dos ductos, ambos os anticorpos apresentam marcação positiva, entretanto SPLUNC1 mostra-se negativo. Na glândula submandibular, SPLUNC2A apresenta marcação positiva nas células serosas acinares, assim como nos ductos interlobulares, entretanto SPLUNC2B apresenta marcação somente em poucas células serosas, sendo negativo nos ductos interlobulares. O anticorpo para SPLUNC1 apresenta marcação positiva somente para as células tubulares mucinosas. Na glândula sublingual, SPLUNC2A apresenta marcação fortemente positiva nas semiluas serosas e SPLUNC1 apresenta marcação positiva nos ductos secretores de muco enquanto que SPLUNC2B mostrou-se negativo (Bingle *et al.*, 2009).

Nas glândulas salivares menores da região oro e nasofaríngea, as glândulas da região de tonsilas palatinas apresentaram marcação positiva semelhante entre os anticorpos SPLUNC2A, SPLUNC2B e SPLUNC1. Na região posterior da língua, as glândulas salivares apresentaram um padrão de marcação semelhante ao das glândulas sublinguais. O anticorpo SPLUNC1 apresentou marcação positiva nos túbulos mucosos e o anticorpo SPLUNC2A apresentou marcação positiva forte para as semiluas serosas, enquanto SPLUNC2B foi negativo. No caso das glândulas menores adjacentes ao tecido respiratório, o anticorpo SPLUNC2B mostrou-se negativo enquanto que SPLUNC1 mostrou-se fortemente positivo (Bingle *et al.*, 2009).

### **3-PROPOSIÇÃO**

#### **3.1 - Objetivo Geral**

O objetivo do presente estudo foi analisar a expressão imunoistoquímica das proteínas da família PLUNC em glândulas salivares maiores e menores, língua e palato em desenvolvimento, removidas de fetos humanos variando entre 12 e 25 semanas de vida intra-uterina.

#### **3.2 - Objetivos específicos**

3.2.1- Avaliar a expressão imunoistoquímica de SPLUNC1 nos ácinos, ductos e plugues de mucina presentes nas glândulas salivares maiores e menores, epitélio lingual e palatino de fetos humanos.

3.2.2- Avaliar a expressão imunoistoquímica de SPLUNC2 nos ácinos, ductos e plugues de mucina presentes nas glândulas salivares maiores e menores, epitélio lingual e palatino de fetos humanos.

3.2.3- Avaliar a expressão imunoistoquímica de LPLUNC1 nos ácinos, ductos e plugues de mucina presentes nas glândulas salivares maiores e menores, epitélio lingual e palatino de fetos humanos.

3.2.4- Correlacionar a expressão destas proteínas com os estágios de morfodiferenciação das glândulas salivares maiores e menores durante a vida intra-uterina.

## 4-MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 - Caracterização da amostra

O presente estudo avaliou as glândulas salivares maiores e menores, palato e língua de 26 fetos humanos pertencentes ao arquivo da disciplina de Patologia Geral da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOUSP), com idade variando entre 12 e 25 semanas de VIU.

O período de VIU foi mensurado pela medida em centímetros do pé dos fetos avaliados, seguindo o padrão estabelecido por Potter & Craig (1975) (tabela 1).

**Tabela 1: Medidas de fetos de 11-26 semanas de gestação (valores médios)**

| <b>Tempo de VIU (semanas)</b> | <b>Tamanho do Pé (cm)</b> |
|-------------------------------|---------------------------|
| 11                            | 0,9                       |
| 12                            | 1,1                       |
| 13                            | 1,4                       |
| 14                            | 1,7                       |
| 15                            | 2,1                       |
| 16                            | 2,2                       |
| 17                            | 2,4                       |
| 18                            | 2,6                       |
| 19                            | 2,9                       |
| 20                            | 3,2                       |
| 21                            | 3,4                       |
| 22                            | 3,8                       |
| 24                            | 4,1                       |
| 26                            | 4,5                       |

Foram avaliadas as glândulas salivares maiores e menores dos fetos que possuíam o material embocado em parafina, disponíveis no arquivo da FOUSP. A amostra totalizou 25 glândulas salivares maiores, divididas entre

parótida (n=7), submandibular (n=13) e sublingual (n=5) e 33 glândulas salivares menores, divididas de acordo com a sua localização: lábio (n=18), língua (n=6) e palato (n=9) (Tabela 2).

**Tabela 2: Representação dos fetos avaliados quanto ao local da glândula salivar avaliada e tempo de vida intra-uterina (VIU).**

| <b>Feto</b> | <b>Local</b>  | <b>Período de VIU (semanas)</b> |
|-------------|---------------|---------------------------------|
| FT01        | Lábio         | 14                              |
| FT02        | Lábio         | 23                              |
| FT03        | Sublingual    | 25                              |
| FT05        | Língua        | 20                              |
| FT05        | Palato        | 20                              |
| FT08        | Palato        | 17                              |
| FT08        | Lábio         | 17                              |
| FT08        | Língua        | 17                              |
| FT11        | Lábio         | 16                              |
| FT11        | Sublingual    | 16                              |
| FT11        | Palato        | 16                              |
| FT12        | Submandibular | 22                              |
| FT12        | Língua        | 22                              |
| FT12        | Sublingual    | 22                              |
| FT12        | Lábio         | 22                              |
| FT12        | Palato        | 22                              |
| FT13        | Sublingual    | 21                              |
| FT13        | Língua        | 21                              |
| FT14        | Submandibular | 20                              |
| FT14        | Lábio         | 20                              |
| FT15        | Submandibular | 19                              |
| FT15        | Parótida      | 19                              |
| FT16        | Submandibular | 21                              |
| FT16        | Lábio         | 21                              |
| FT17        | Submandibular | 20                              |
| FT18        | Submandibular | 21                              |
| FT18        | Lábio         | 21                              |

**Tabela 2: Representação dos fetos avaliados quanto ao local da glândula salivar avaliada e tempo de vida intra-uterina (VIU).**

| <b>Feto</b> | <b>Local</b>  | <b>Período de VIU (semanas)</b> |
|-------------|---------------|---------------------------------|
| FT18        | Língua        | 21                              |
| FT18        | Palato        | 21                              |
| FT19        | Submandibular | 19                              |
| FT19        | Parótida      | 19                              |
| FT20        | Parótida      | 19                              |
| FT21        | Lábio         | 20                              |
| FT21        | Lábio         | 20                              |
| FT21        | Parótida      | 20                              |
| FT21        | Submandibular | 20                              |
| FT22        | Submandibular | 20                              |
| FT22        | Parótida      | 20                              |
| FT22        | Sublingual    | 20                              |
| FT23        | Lábio         | 21                              |
| FT23        | Submandibular | 21                              |
| FT23        | Parótida      | 21                              |
| FT24        | Submandibular | 18                              |
| FT24        | Lábio         | 18                              |
| FT25        | Parótida      | 16                              |
| FT26        | Submandibular | 20                              |
| FT26        | Palato        | 20                              |
| FT26        | Lábio         | 20                              |
| FT28        | Lábio         | 22                              |
| FT29        | Lábio         | 21                              |
| FT29        | Lábio         | 21                              |
| FT29        | Palato        | 21                              |
| FT30        | Lábio         | 20                              |
| FT30        | Lábio         | 20                              |
| FT32        | Submandibular | 12                              |
| FT32        | Língua        | 12                              |
| FT32        | Palato        | 12                              |
| FT33        | Palato        | 12                              |

O estudo foi realizado utilizando técnicas imunoistoquímicas e as glândulas salivares foram classificadas segundo os estágios de morfodiferenciação utilizado por Tucker (2007) para a avaliação do padrão de expressão imunoistoquímico. O epitélio respiratório da região palatina e o epitélio de superfície da língua também foram avaliados quanto à expressão de SPLUNC1, SPLUNC2 e LPLUNC1, sendo classificados como positivos ou negativos.

O material não foi coletado com intuito de realizar o presente estudo, sendo proveniente de processos de abortos espontâneos que foram submetidos à análise histopatológica e encontram-se arquivados no Departamento de Patologia da FOUSP. O projeto foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas (FOP-UNICAMP) (Anexo).

#### **4.2 - Estágios de morfodiferenciação das glândulas salivares**

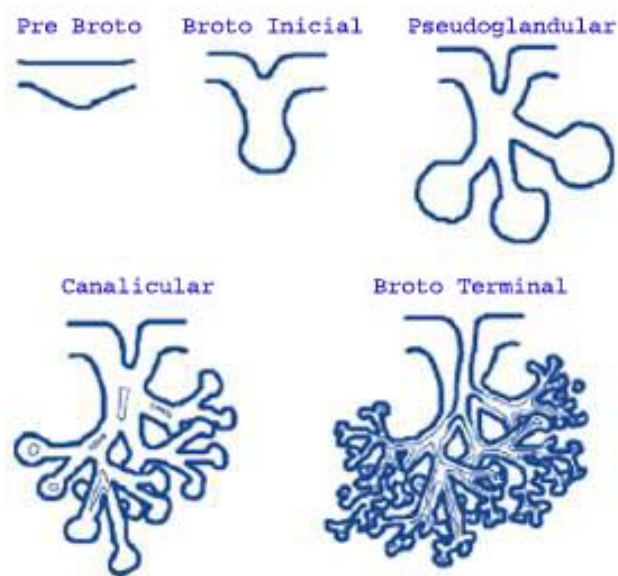
As glândulas salivares maiores e menores avaliadas no presente estudo foram classificadas de acordo com os estágios de morfodiferenciação utilizado por Tucker (2007). O autor utilizou a classificação do padrão de morfodiferenciação das glândulas submandibulares de ratos, subdividindo-a em cinco estágios (Figura 2):

- Pré-broto – estágio caracterizado pelo visível espessamento do epitélio (Figura 3);
- Broto Inicial – espessamento proeminente do epitélio para dentro do mesênquima adjacente, formando um broto ligado à superfície oral por um ducto. Este canal vai continuar a formar o conduto principal da glândula salivar e é visível como uma ondulação ligeira na superfície oral, onde a formação do lúmen já iniciou (Figura 4);
- Pseudoglandular – o broto sofre ramificação para a produção de um agregado de ramos e brotos. O epitélio começa sua morfogênese ramificando

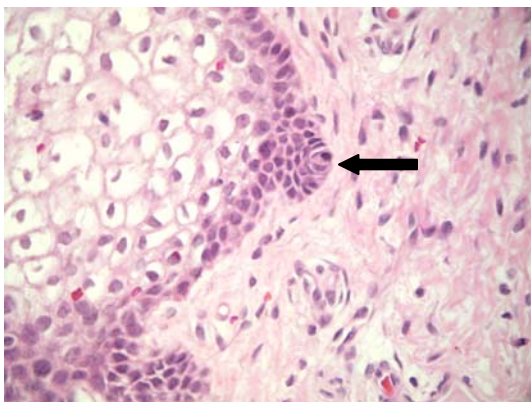
brotos que continuam proliferando, produzindo uma glândula multilobulada (Figura 5);

- Canalicular – a maioria dos ductos forma seu lúmen nessa fase. As células epiteliais em torno do presumível lúmen se apresentam ativamente proliferativas enquanto que as do centro entram em apoptose. Nesse estágio, uma boa diferenciação do lúmen pode ser observada na região terminal do broto e no presumível lúmen, entretanto a continuidade entre ductos e lúmen ainda não está completa (Figura 6);

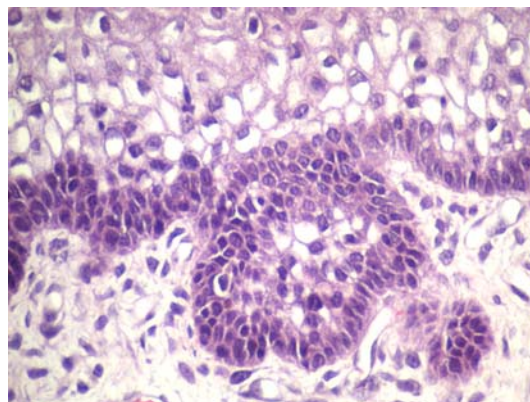
- Broto Terminal – ocorre a diferenciação final dos túbulos granulares espiralados, esta fase de diferenciação continua no período pós-natal (Figura 7).



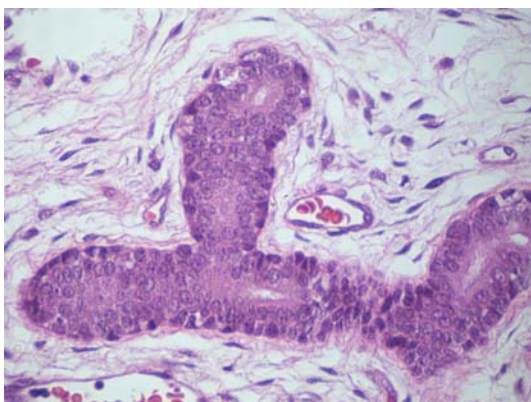
**Figura 2: Estágios de desenvolvimento das glândulas salivares segundo Tucker (2007).**



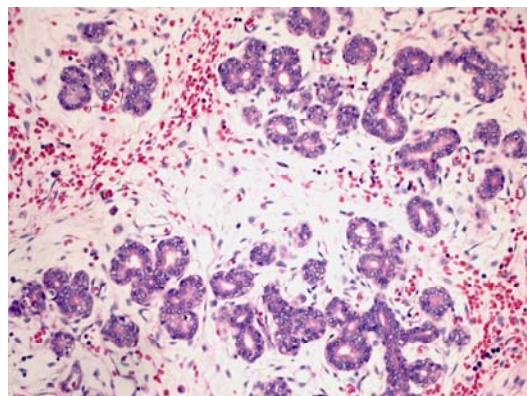
**Figura 3: Estágio Pré-Broto.**



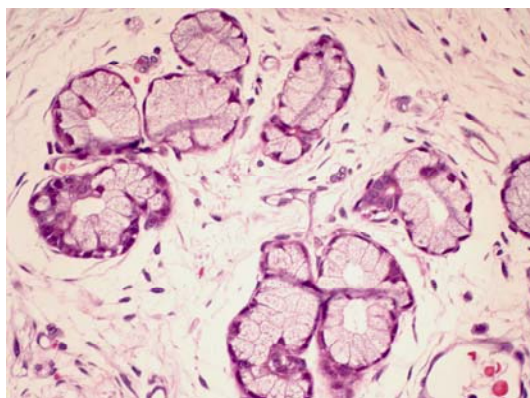
**Figura 4: Estágio Broto Inicial.**



**Figura 5: Estágio Pseudoglandular.**



**Figura 6: Estágio Canalicular.**



**Figura 7: Estágio Broto Terminal.**



#### **4.3 - Reações de Imunoistoquímica: Protocolo das Reações**

As reações para avaliação do padrão de expressão da proteína PLUNC nas glândulas salivares maiores e menores em desenvolvimento foram efetuadas no Laboratório de Patologia Oral FOP-UNICAMP. Os seguintes anticorpos foram utilizados: SPLUNC1 (diluição 1:300), SPLUNC2A (diluição 1:250) , SPLUNC2B (diluição 1:500) e LPLUNC1 (diluição 1:600). Esses anticorpos não são comerciais e foram doados para essa pesquisa pela Dra. Lynne Bingle do Departamento de Patologia Oral da Faculdade de Odontologia da Universidade de Sheffield. Os anticorpos foram gerados através da injeção de peptídeos sintéticos em coelhos. Para avaliar a presença de SPLUNC2, foram utilizados dois anticorpos anti-peptídeos purificados: SPLUNC2A e SPLUNC2B, o primeiro reconhece um epítipo encontrado internamente na proteína enquanto o SPLUNC2B reconhece um epítipo na extremidade C-terminal da proteína. A seqüência de peptídeos corresponde aos aminoácidos 156–168: (VTIETDPQTHQPV), chamado de SPLUNC2A e aos aminoácidos 236-249-COOH (VDNPQHKTQLQTLI), chamado de SPLUNC2B. Para LPLUNC1 a seqüência de peptídeo corresponde aos aminoácidos 139-154 (TIRMDTSASGPTRLV), o qual está localizado no primeiro domínio para BPI.

O seguinte protocolo foi utilizado: inicialmente foram obtidos cortes parafinados de 3µm de espessura montados em lâminas silanizadas de todos os casos selecionados. Em seguida foi realizada a primeira desparafinização em xilol por cinco minutos e segunda desparafinização em xilol por mais cinco minutos. A próxima etapa consistiu em duas hidratações dos cortes em etanol absoluto e álcool 70% por cinco minutos cada, seguida por lavagens em água corrente e destilada. Foi então realizado o bloqueio da peroxidase endógena, em água oxigenada (3% em metanol) por 20 minutos, e lavado rapidamente em PBS.

A recuperação antigênica, quando necessária, foi realizada pela fervura em microondas, com solução de citrato de sódio (tribásico) 0.01M por oito

minutos, deixando esfriar até atingir a temperatura ambiente seguida por lavagem em PBS. Posteriormente, foi realizado um bloqueio de proteínas com 100% soro fetal de cabra (Sigma Aldrich), em câmara úmida por 30 minutos em temperatura ambiente. Então, foi efetuada a incubação por 18 horas a 4°C com o anticorpo primário diluído em soro fetal de cabra diluído de acordo com as especificações citadas acima. Um controle negativo utilizando anticorpo IgG (Dako) foi utilizado em cada caso. As lâminas foram lavadas duas vezes em PBS sob agitação por cinco minutos cada e então incubadas com anticorpos secundários conjugados com peroxidase (Vectastain Elite ABC kit, Rabbit, Vector Laboratories) por 30 minutos em temperatura ambiente, seguido de duas lavagens em PBS sob agitação por cinco minutos cada. Após isso, as lâminas foram incubadas com complexo Avidina – Biotina (Vectastain Elite ABC kit, Rabbit, Vector Laboratories) por mais 30 minutos em temperatura ambiente. Após, foi feita uma nova lavagem com PBS com duas trocas de cinco minutos sob agitação. Na próxima etapa as lâminas foram reveladas com o substrato cromógeno para peroxidase (Vector NovaRed, Substrate kit for peroxidase) por dois a cinco minutos ou até o aparecimento de cor em temperatura ambiente, em seguida, foram lavadas em água destilada por cinco minutos. As lâminas foram então contra-coradas com Hematoxilina e lavadas em água corrente e água destilada. Os cortes foram desidratados em banhos de álcool 70%, 90% e absoluto seguido pela diafanização em xilol e montagem das lâminas com resina de baixa viscosidade.

#### **4.4 - Avaliação da marcação imunoistoquímica.**

A avaliação da marcação imunoistoquímica para os anticorpos SPLUNC1, SPLUNC2A, SPLUNC2B e LPLUNC1 nas glândulas salivares maiores e menores em desenvolvimento embrionário, no epitélio respiratório do palato e epitélio de superfície da língua foram classificadas como positivas ou negativas.

## 5-RESULTADOS:

Os fetos avaliados apresentaram tempo de VIU entre 12 e 25 semanas, com média de 19,20 semanas. Dentre os 26 fetos avaliados, 13 (50%) apresentaram positividade para proteínas da família PLUNC. Nenhum dos 26 fetos da amostra apresentou positividade para os marcadores SPLUNC2A e SPLUNC2B. Apenas dois (7,7%) fetos apresentaram marcação positiva para LPLUNC1 e 13 (50%) fetos apresentaram marcação positiva para SPLUNC1.

Dentre as 58 amostras avaliadas, 17 apresentaram positividade para as proteínas da família PLUNC. Nenhuma das 25 amostras de glândulas salivares maiores e 33 amostras de glândulas salivares menores avaliadas, apenas duas (3,45%) amostras apresentaram marcação positiva para LPLUNC1 e 17 (29,31%) amostras apresentaram marcação positiva para SPLUNC1 (Tabela 3).

**Tabela 3: Representação de todas as amostras de glândulas salivares maiores e menores quanto à expressão de SPLUNC1, SPLUNC2A, SPLUNC2B, LPLUNC1.**

| Localização           | SPLUNC1<br>N (%)   | SPLUNC2A<br>N (%) | SPLUNC2B<br>N (%) | LPLUNC1<br>N (%) | Amostras<br>Avaliadas |
|-----------------------|--------------------|-------------------|-------------------|------------------|-----------------------|
| Parótida              | 0                  | 0                 | 0                 | 0                | 7 (100%)              |
| Submandibular         | 4 (30,77%)         | 0                 | 0                 | 1 (7,7%)         | 13 (100%)             |
| Sublingual            | 4 (80%)            | 0                 | 0                 | 1 (20%)          | 5 (100%)              |
| Palato                | 3 (33,33%)         | 0                 | 0                 | 0                | 9 (100%)              |
| Lábio                 | 4 (22,20%)         | 0                 | 0                 | 0                | 18 (100%)             |
| Língua                | 2 (33,33%)         | 0                 | 0                 | 0                | 6 (100%)              |
| <b>Total de Casos</b> | <b>17 (29,31%)</b> | <b>0</b>          | <b>0</b>          | <b>2 (3,45%)</b> | <b>58 (100%)</b>      |

**Legenda:** N: número de casos positivos; (%): percentual de casos positivos.

A tabela 4 apresenta as glândulas salivares avaliadas nos 26 fetos que fizeram parte da amostra quanto à localização da glândula e o estágio de morfodiferenciação glandular predominante.

**Tabela 4: Representação das amostras avaliadas quanto ao tipo de glândula salivar e o estágio de morfodiferenciação predominante.**

| <b>Localização</b>   | <b>Pré-Broto /<br/>Broto Inicial<br/>N (%)</b> | <b>Pseudoglandular<br/>N (%)</b> | <b>Canalicular<br/>N (%)</b> | <b>Broto<br/>Terminal<br/>N (%)</b> | <b>Total<br/>N (%)</b> |
|----------------------|------------------------------------------------|----------------------------------|------------------------------|-------------------------------------|------------------------|
| <b>Parótida</b>      | 0                                              | 2 (28,6%)                        | 5 (71,4%)                    | 0                                   | 7 (100%)               |
| <b>Submandibular</b> | 0                                              | 0                                | 12 (92,31%)                  | 1 (7,69%)                           | 13 (100%)              |
| <b>Sublingual</b>    | 0                                              | 1 (20%)                          | 0                            | 4 (80%)                             | 5 (100%)               |
| <b>Palato</b>        | 0                                              | 4 (44,44%)                       | 1 (11,12%)                   | 4 (44,44%)                          | 9 (100%)               |
| <b>Lábio</b>         | 0                                              | 5 (27,8%)                        | 4 (22,2%)                    | 9 (50%)                             | 18 (100%)              |
| <b>Língua</b>        | 0                                              | 4 (66,67%)                       | 0                            | 2 (33,33%)                          | 6 (100%)               |
| <b>Total</b>         | 0                                              | 16                               | 22                           | 20                                  | 58                     |

**Legenda: N: número; (%): percentual**

Dentre as 25 glândulas salivares maiores avaliadas, 17 (68%) apresentaram predominância do padrão canalicular de morfodiferenciação, cinco (20%) apresentaram o padrão broto terminal, enquanto que três (12%) apresentaram predominância do padrão pseudoglandular. Dentre as sete glândulas parótidas avaliadas, cinco (71,4%) apresentaram predominância do padrão canalicular de morfodiferenciação e duas (28,6%) apresentaram predominância do padrão pseudoglandular. Dentre as 13 glândulas submandibulares avaliadas, 12 (92,31%) apresentaram predominância do padrão canalicular de morfodiferenciação e somente uma (7,69%) apresentou predominância do padrão broto terminal. Dentre as cinco glândulas sublinguais avaliadas, quatro (80%) apresentaram predominância do padrão broto terminal de morfodiferenciação e uma (20%) apresentou predominância pelo padrão pseudoglandular.

Dentre as 33 glândulas salivares menores avaliadas, 15 (45,45%) apresentaram predominância do padrão broto terminal de morfodiferenciação, cinco (15,15%) apresentaram predominância do padrão canalicular, 13 (39,4%) apresentaram predominância do padrão pseudoglandular. Dentre os nove casos de glândulas localizadas na região do palato, quatro (44,44%) apresentaram

predominância do padrão broto terminal de morfodiferenciação, quatro (44,44%) apresentaram predominância do padrão pseudoglandular e uma (11,12%) apresentou predominância do padrão canalicular. Dentre os 18 casos de glândulas localizadas na região do lábio, nove (50%) apresentavam predominância do padrão broto terminal de morfodiferenciação, cinco (27,8%) apresentavam predominância do padrão pseudoglandular, quatro (22,2%) apresentavam o padrão canalicular. Finalmente, dentre as seis glândulas que se localizavam na região da língua, duas (33,33%) apresentaram predominância do padrão broto terminal de morfodiferenciação e quatro (66,67%) do padrão pseudoglandular.

A tabela 5 apresenta os fetos, com o respectivo tipo de glândula salivar e o estágio de morfodiferenciação que apresentaram positividade para SPLUNC1.

**Tabela 5: Glândulas salivares de fetos humanos que apresentaram positividade para o marcador SPLUNC1.**

| <b>Feto</b> | <b>Local</b> | <b>Estágio de Morfodiferenciação</b> | <b>Marcação Imunoistoquímica</b>                                 |
|-------------|--------------|--------------------------------------|------------------------------------------------------------------|
| FT03        | Sublingual   | Broto Terminal                       | No citoplasma das células mucosas dos túbulos mucosos primitivos |
| FT5         | Língua       | Broto Terminal                       | No citoplasma das células ductais dos ácinos primitivos          |
| FT11        | Sublingual   | Broto Terminal                       | No citoplasma das células mucosas dos túbulos mucosos primitivos |
| FT11        | Palato       | Broto Terminal                       | No citoplasma das células mucosas dos túbulos mucosos primitivos |
| FT12        | Palato       | Broto Terminal                       | No citoplasma das células mucosas dos túbulos mucosos primitivos |
| FT12        | Língua       | Broto Terminal                       | No citoplasma das células mucosas dos túbulos mucosos primitivos |
| FT12        | Sublingual   | Broto Terminal                       | No citoplasma das células mucosas dos túbulos mucosos primitivos |

**Tabela 5: Glândulas salivares de fetos humanos que apresentaram positividade para o marcador SPLUNC1.**

| <b>Feto</b> | <b>Local</b>  | <b>Estágio de Morfodiferenciação</b> | <b>Marcação Imunoistoquímica</b>                                        |
|-------------|---------------|--------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|
| FT12        | Lábio         | Broto Terminal                       | No citoplasma das células mucosas dos túbulos mucosos primitivos        |
| FT13        | Sublingual    | Broto Terminal                       | No citoplasma das células mioepiteliais e ductais dos ácinos primitivos |
| FT14        | Lábio         | Broto Terminal                       | No plugue de mucina dos ductos estriados primitivos                     |
| FT14        | Submandibular | Canalicular                          | No plugue de mucina dos ductos estriados primitivos                     |
| FT15        | Submandibular | Canalicular                          | No plugue de mucina dos ductos estriados primitivos                     |
| FT18        | Submandibular | Canalicular                          | No plugue de mucina dos ductos estriados primitivos                     |
| FT26        | Palato        | Broto Terminal                       | No citoplasma das células mucosas dos túbulos mucosos primitivos        |
| FT29        | Lábio         | Broto Terminal                       | No plugue de mucina dos ductos estriados primitivos                     |
| FT29        | Lábio         | Broto Terminal                       | No citoplasma das células mucosas dos túbulos mucosos primitivos        |
| FT32        | Submandibular | Canalicular                          | No plugue de mucina dos ductos estriados primitivos                     |

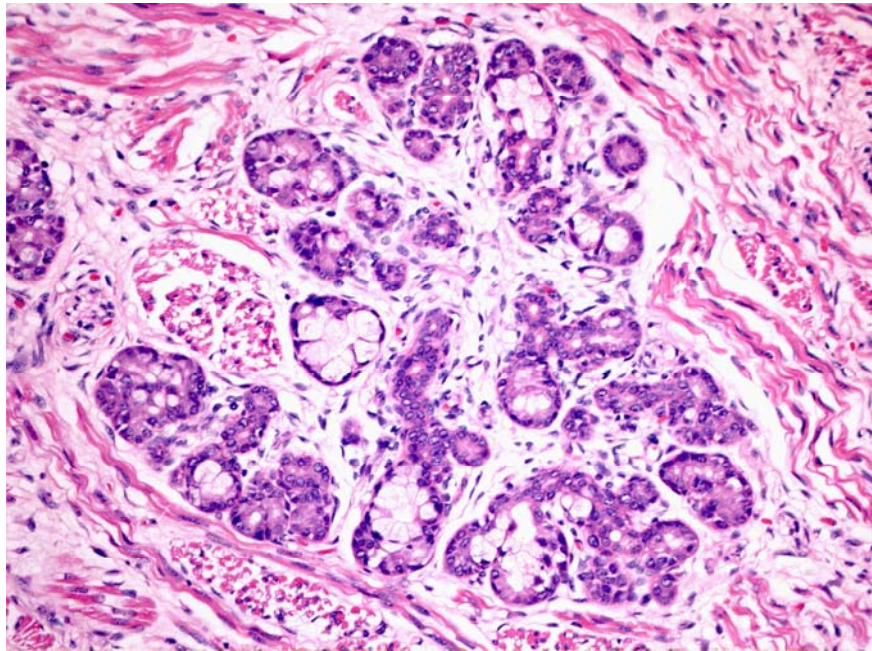
Dentre as 58 amostras de glândulas salivares analisadas, 17 (29,31%) apresentaram marcação positiva para SPLUNC1, predominando o estágio de morfodiferenciação broto terminal entre as amostras positivas (n=13, 76,47%). O estágio de morfodiferenciação canalicular apresentou predominância em 22 (37,93%) amostras, expressando SPLUNC1 em quatro (18,18%) amostras. O estágio broto terminal foi predominante em 20 (34,48%) amostras, expressando

SPLUNC1 em 13 (65%) amostras. Entretanto, o estágio pseudoglandular foi predominante em 16 (27,59%), sendo negativo para SPLUNC1 em todos os casos.

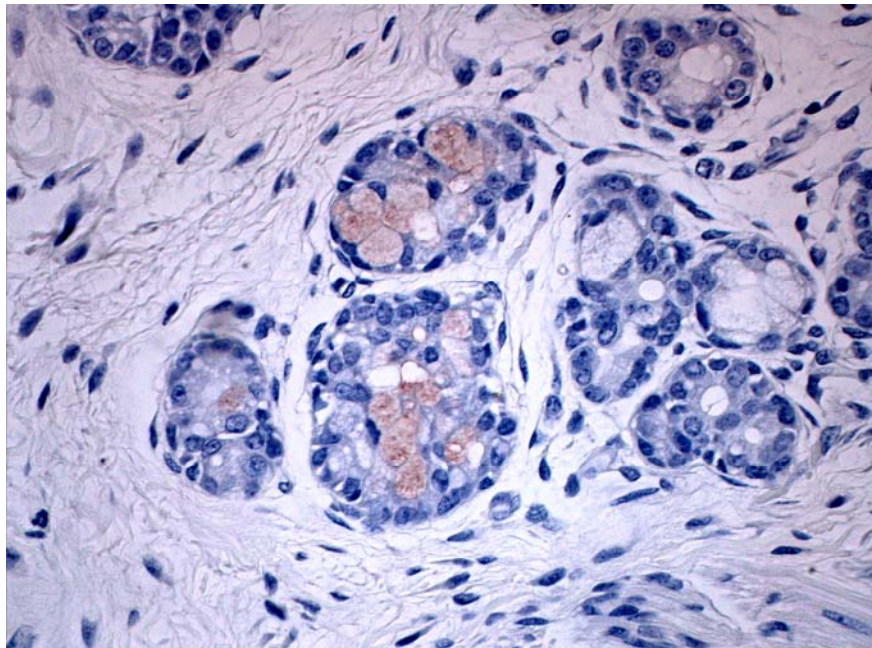
Dentre as 25 glândulas salivares maiores avaliadas, oito (32%) apresentaram positividade para SPLUNC1. Dentre as 13 glândulas submandibulares avaliadas para SPLUNC1, quatro (30,77%) apresentaram imunomarcação positiva e as quatro apresentaram predominância do padrão canalicular de morfodiferenciação. Dentre as cinco glândulas sublinguais avaliadas, quatro (80%) apresentaram imunomarcação positiva para SPLUNC1 e as quatro apresentaram predominância do padrão broto terminal de morfodiferenciação. Dentre as sete glândulas parótidas avaliadas, nenhuma apresentou imunomarcação positiva para SPLUNC1.

Dentre as 33 glândulas salivares menores avaliadas, nove (27,27%) apresentaram positividade para SPLUNC1 e as nove apresentaram predominância do padrão broto terminal de morfodiferenciação. Dentre os 18 casos onde a glândula se localizava na região do lábio, somente quatro (22,22%) apresentaram positividade para SPLUNC1. Dentre as seis glândulas que se localizavam na região da língua, duas (33,33%) apresentaram imunopositividade para SPLUNC1. Finalmente, dentre as nove glândulas que se localizavam na região do palato, três (33,33%) apresentaram imunomarcação positiva para SPLUNC1.

O padrão da marcação imunoistoquímica para SPLUNC1 nas glândulas salivares no estágio de broto terminal (Figuras 8 e 12) apresentaram marcação positiva no citoplasma das células mucosas dos túbulos mucosos primitivos e no citoplasma das células epiteliais e mioepiteliais dos ácinos primitivos (Figuras 9, 10, 11, 13 e 14). No caso das glândulas salivares em estágio canalicular de morfodiferenciação (Figuras 15 e 19) a marcação positiva para SPLUNC1 ocorreu no plugue de mucina no interior dos ductos estriados primitivos (Figuras 16, 17, 18, 20 e 21).

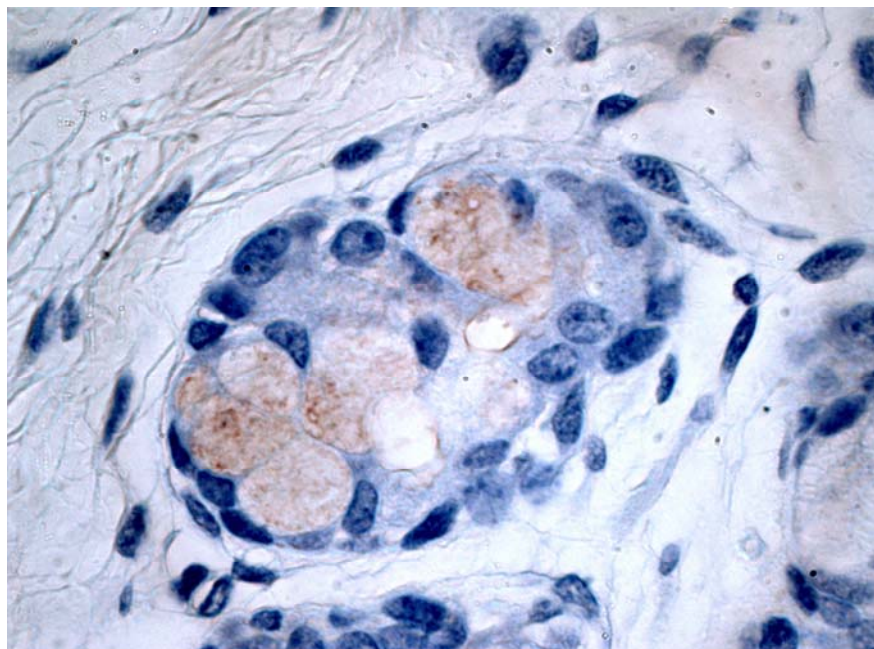


**Figura 8: FT-12 Glândula salivar menor labial. Estágio Broto Terminal de morfodiferenciação (Hematoxilina & Eosina. Aumento original, 200x).**

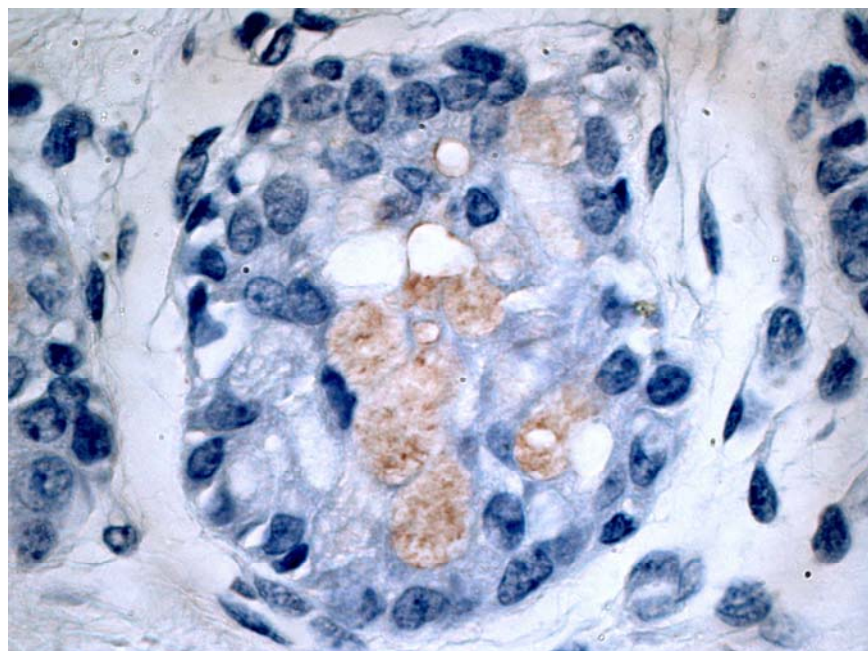


**Figura 9: FT-12 Glândula salivar menor labial mostrando marcação positiva para SPLUNC1 no citoplasma das células mucosas primitivas presente nos túbulos mucosos da glândula no estágio de broto terminal (Imunoistoquímica. Aumento original, 400x).**

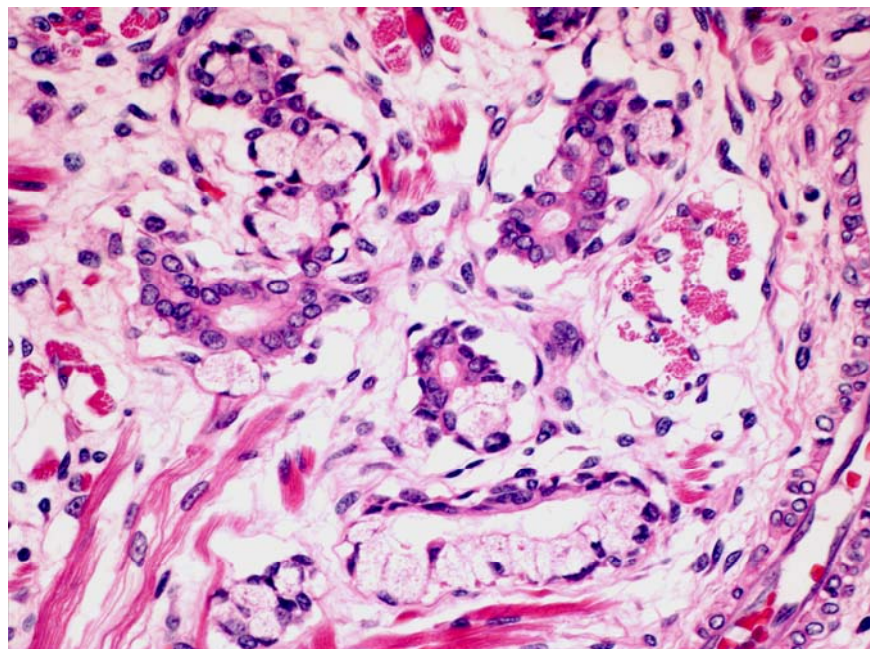




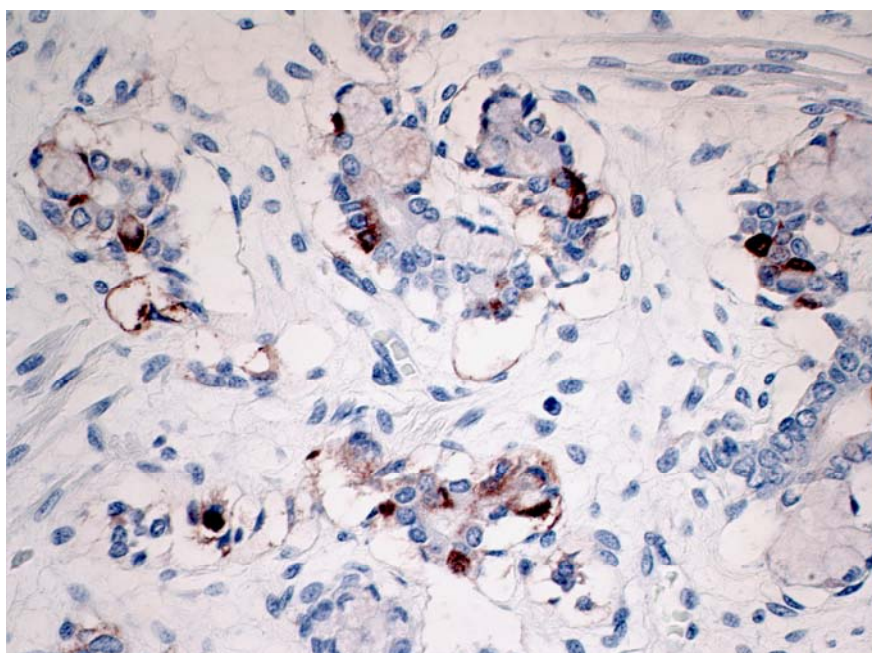
**Figura 10: Maior aumento da figura 9 mostrando marcação positiva para SPLUNC1 no citoplasma das células mucosas primitivas presente no túbulo mucoso da glândula no estágio de broto terminal (Imunoistoquímica. Aumento original 1000x).**



**Figura 11: Maior aumento da figura 9 mostrando marcação positiva para SPLUNC1 no citoplasma das células mucosas primitivas presente no túbulo mucoso da glândula no estágio de broto terminal (Imunoistoquímica. Aumento original 1000x).**

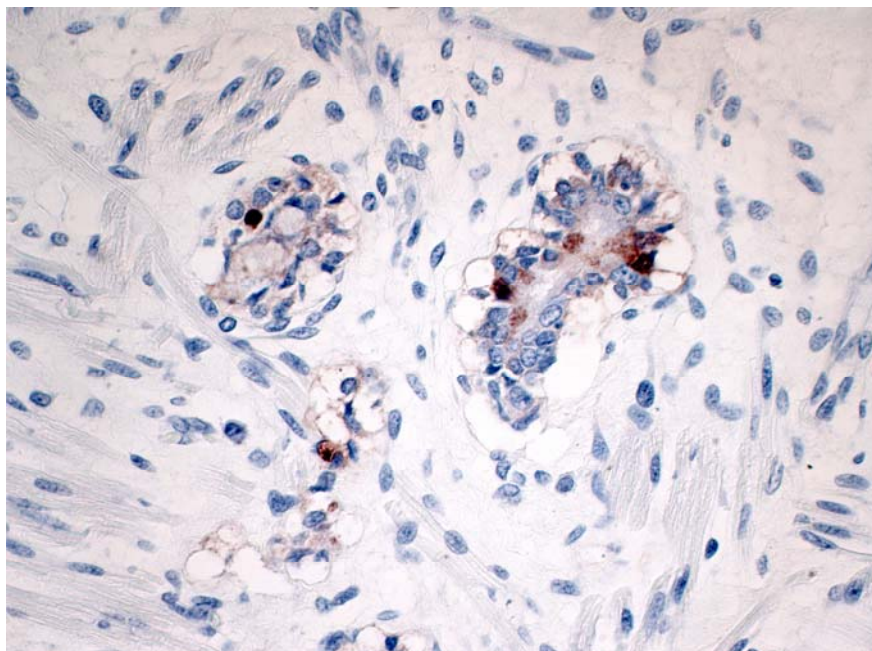


**Figura 12: FT-13 Glândula sublingual. Estágio Broto Terminal de Morfodiferenciação (Hematoxilina & Eosina. Aumento original 400x).**

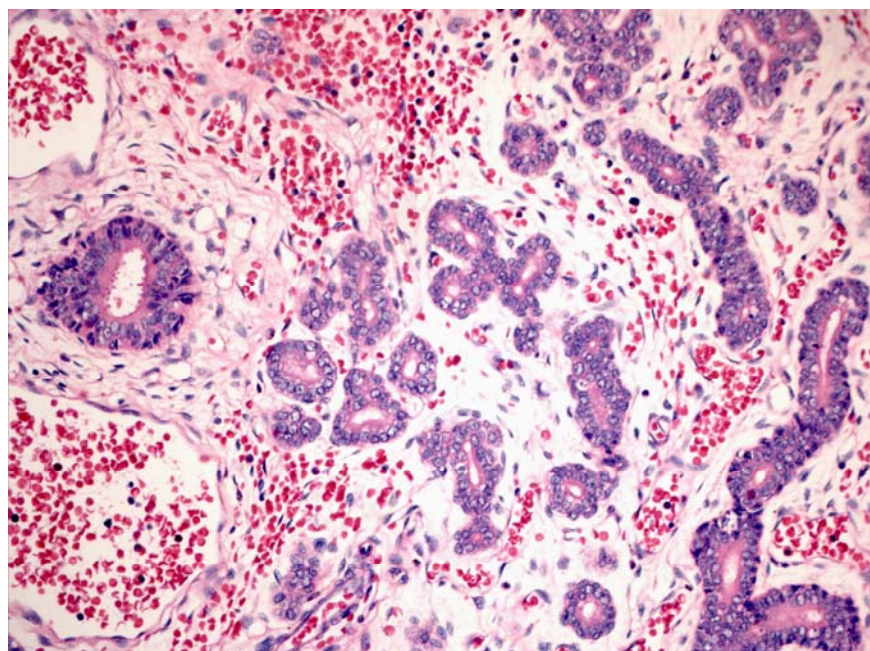


**Figura 13: FT-13 Glândula sublingual mostrando marcação positiva para SPLUNC1 nas células epiteliais e mioepiteliais que envolvem os ácinos lobulares primitivos da glândula no estágio de broto terminal (Imunoistoquímica. Aumento original 400x).**

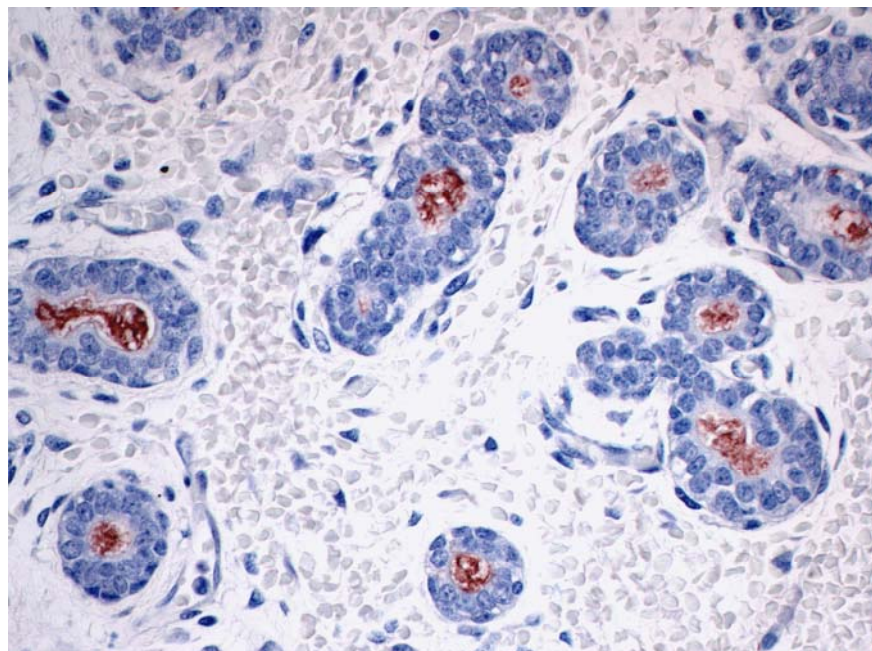




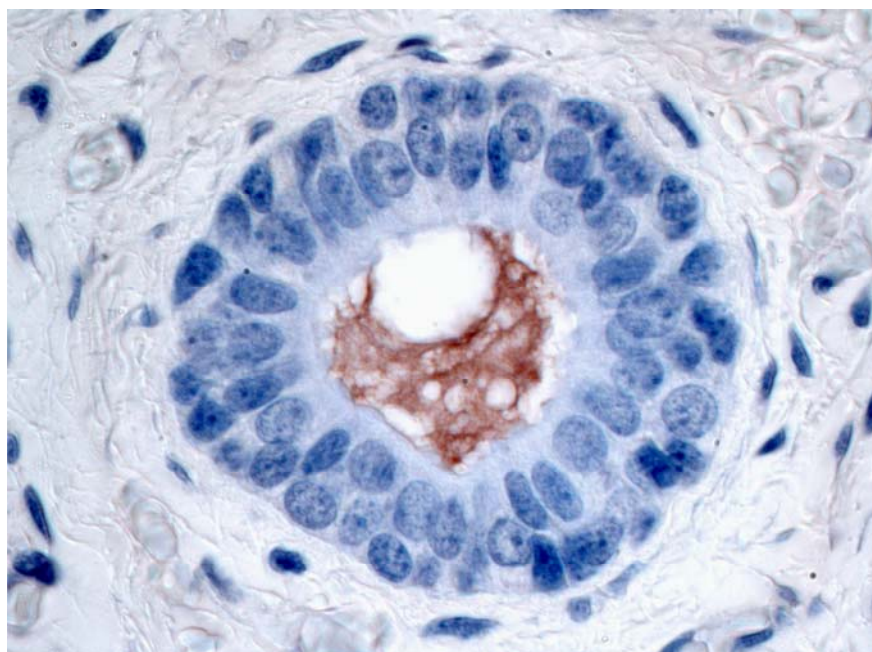
**Figura 14: FT-5 Glândula salivar menor lingual mostrando marcação positiva para SPLUNC1 nas células epiteliais dos ácinos lobulares primitivos da glândula no estágio de broto terminal (Imunoistoquímica. Aumento original 400x).**



**Figura 15: FT-14 Glândula submandibular. Estágio Canalicular de morfodiferenciação. (Hematoxilina & Eosina. Aumento original 200x).**

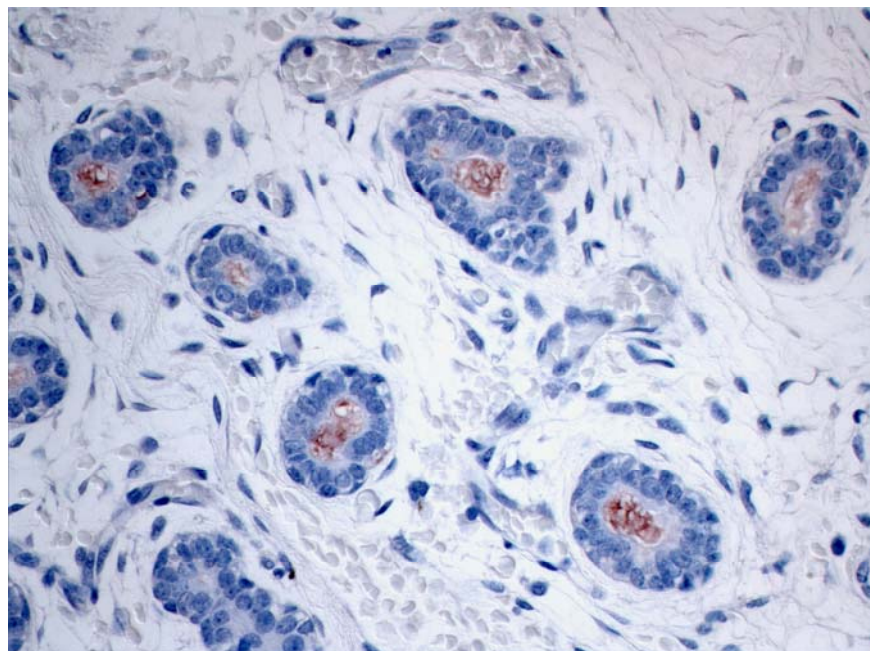


**Figura 16: FT-14 Glândula submandibular mostrando marcação positiva para SPLUNC1 nos plugues de mucina nos ductos estriados da glândula em estágio de canalização (Imunoistoquímica. Aumento original 400x).**

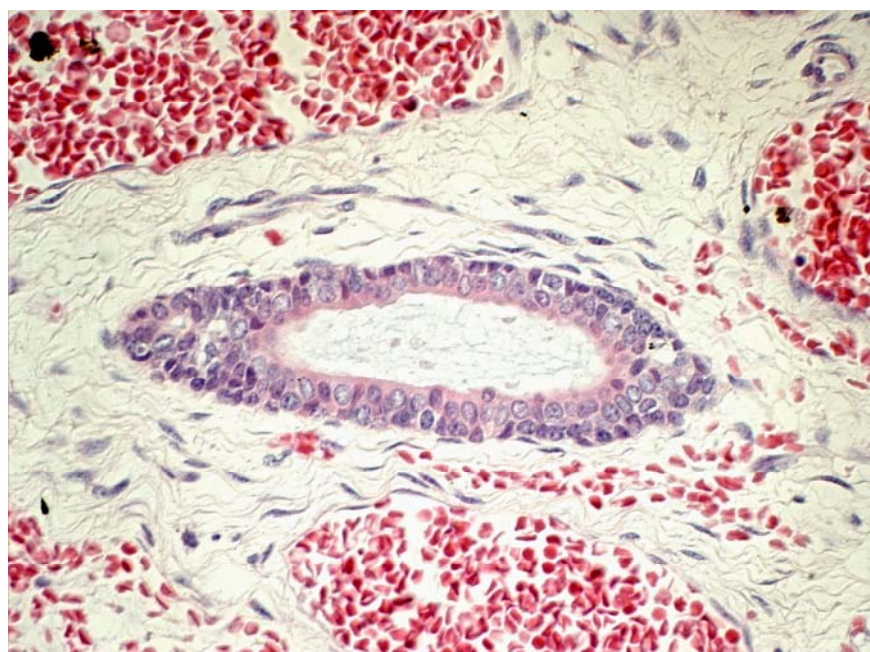


**Figura 17: Maior aumento da figura 16 mostrando marcação positiva para SPLUNC1 em um plugue de mucina no ducto estriado da glândula submandibular em estágio de canalização (Imunoistoquímica. Aumento original 1000x).**

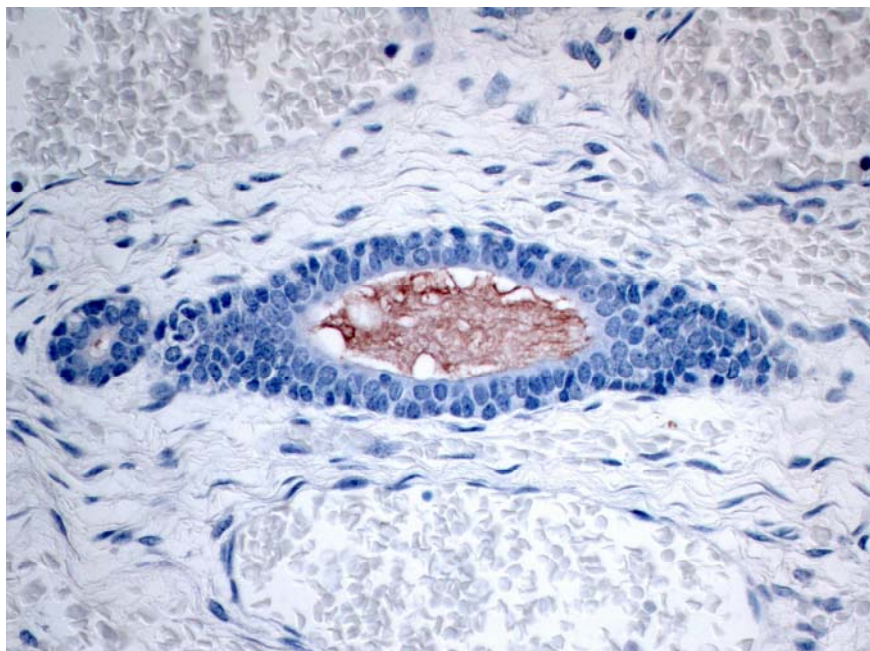




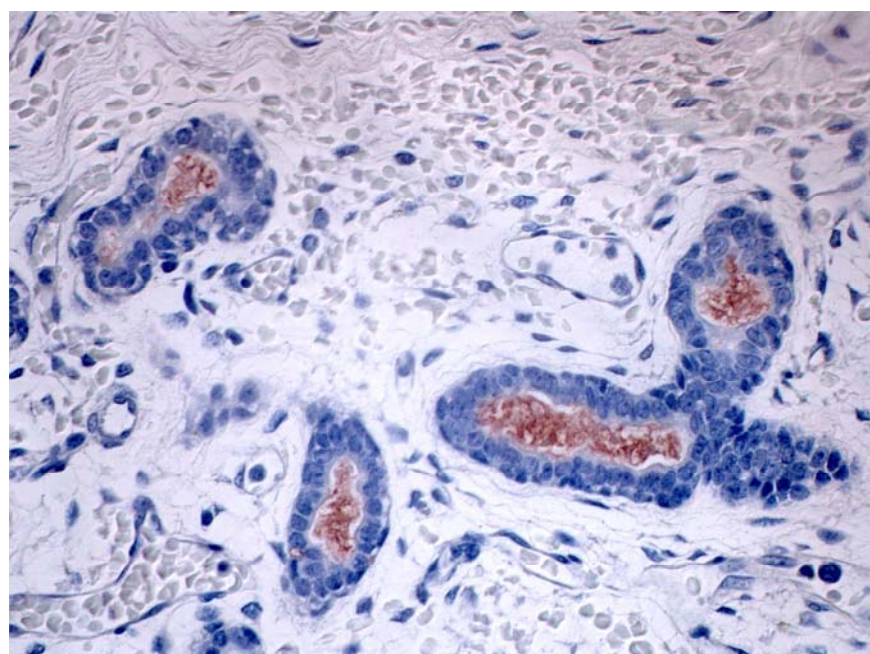
**Figura 18: FT-15 Glândula submandibular mostrando marcação positiva para SPLUNC1 nos plugues de mucina nos ductos estriados da glândula em estágio de canalização (Imunoistoquímica. Aumento original 400x).**



**Figura 19: FT-18 Glândula submandibular (Hematoxilina & Eosina. Aumento original 200x).**



**Figura 20: FT-18 Glândula submandibular mostrando marcação positiva para SPLUNC1 nos plugues de mucina nos ductos estriados da glândula em estágio de canalização (Imunoistoquímica. Aumento original 400x).**



**Figura 21: FT-18 Glândula submandibular mostrando marcação positiva para SPLUNC1 nos plugues de mucina nos ductos estriados da glândula em estágio de canalização (Imunoistoquímica. Aumento original 400x).**

A tabela 6 apresenta os fetos, o estágio de morfodiferenciação e o respectivo tipo de glândula salivar que apresentaram positividade para LPLUNC1.

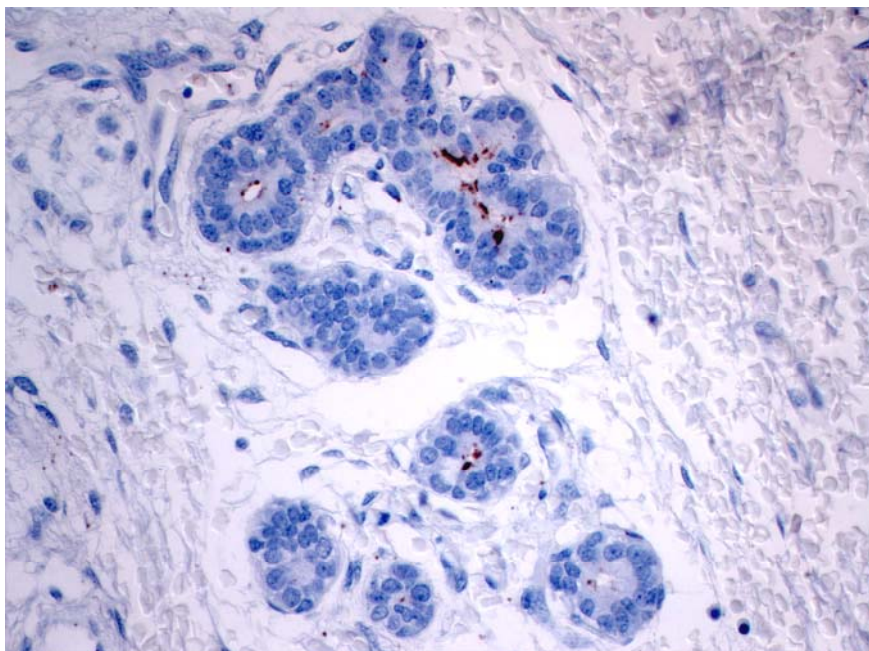
**Tabela 6: Glândulas salivares de Fetos que apresentaram positividade para o marcador LPLUNC1.**

| Feto | Localização   | Estágio de Morfodiferenciação | Marcação Imunoistoquímica                                         |
|------|---------------|-------------------------------|-------------------------------------------------------------------|
| FT13 | Sublingual    | Broto Terminal                | No pólo apical das células epiteliais do ducto estriado primitivo |
| FT18 | Submandibular | Canalicular                   | No pólo apical das células epiteliais do ducto estriado primitivo |

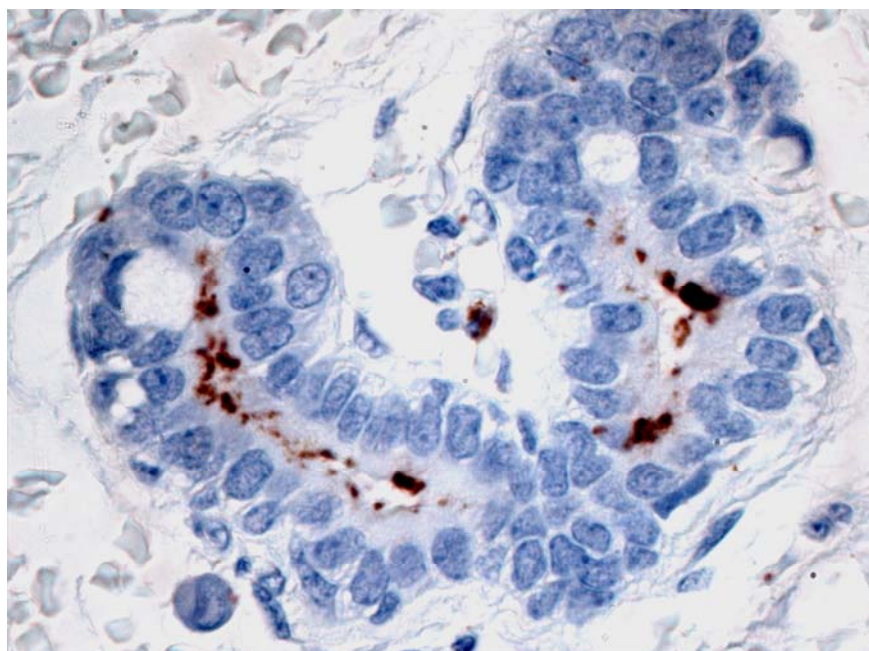
Dentre os 26 fetos avaliados, dois (7,7%) apresentaram positividade para LPLUNC1, sendo somente duas (3,45%) amostras positivas dentre as 58 amostras avaliadas. Dentre as 25 glândulas salivares maiores, duas apresentaram imunopositividade para LPLUNC1. Dentre as 13 glândulas submandibulares avaliadas, uma (7,7%) apresentou imunomarcação positiva para LPLUNC1 e mostrava predomínio do padrão broto terminal de morfodiferenciação. Dentre as cinco glândulas sublinguais avaliadas, uma (20%) apresentou imunomarcação positiva e predomínio do padrão canalicular. Entretanto, entre as sete glândulas parótidas avaliadas, nenhuma apresentou imunomarcação positiva para LPLUNC1.

Dentre as 33 glândulas salivares menores avaliadas, nenhuma apresentou positividade para LPLUNC1. As glândulas salivares positivas para LPLUNC1 apresentaram marcação imunoistoquímica no pólo apical das células dos ductos estriados primitivos (Figuras 22 e 23).





**Figura 22: FT-18 Glândula submandibular apresentando marcação positiva ("in dot") para LPLUNC1 no pólo apical das células epiteliais do ducto estriado da glândula em estágio de canalização (Imunoistoquímica. Aumento original 400x).**



**Figura 23: FT-18 Glândula submandibular apresentando marcação positiva para LPLUNC1 no pólo apical das células epiteliais do ducto estriado da glândula em estágio de canalização (Imunoistoquímica. Aumento original 1000x).**

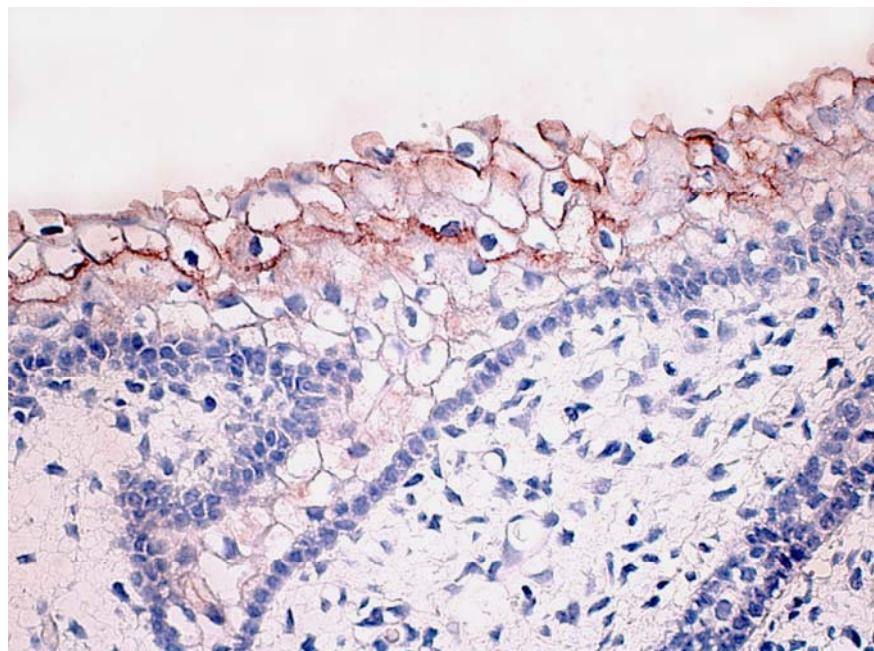


Durante a avaliação das glândulas salivares maiores e menores dos 26 fetos da amostra, outros tipos de tecidos que estavam adjacentes às glândulas salivares apresentaram marcação imunoistoquímica positiva para a proteína SPLUNC1. Os marcadores SPLUNC2A, SPLUNC2B e LPLUNC1 não apresentaram esse padrão de marcação em nenhum dos casos avaliados. Dentre os seis fetos que tiveram glândulas salivares menores da região da língua avaliadas, três (50%) casos apresentaram imunopositividade para SPLUNC1 no epitélio superficial da língua (Figuras 24 e 25). Dentre os nove fetos cujas glândulas salivares menores da região do palato foram avaliadas, seis (66,67%) casos apresentaram imunopositividade para SPLUNC1 nas células ciliadas do epitélio respiratório (Figuras 26 e 27).

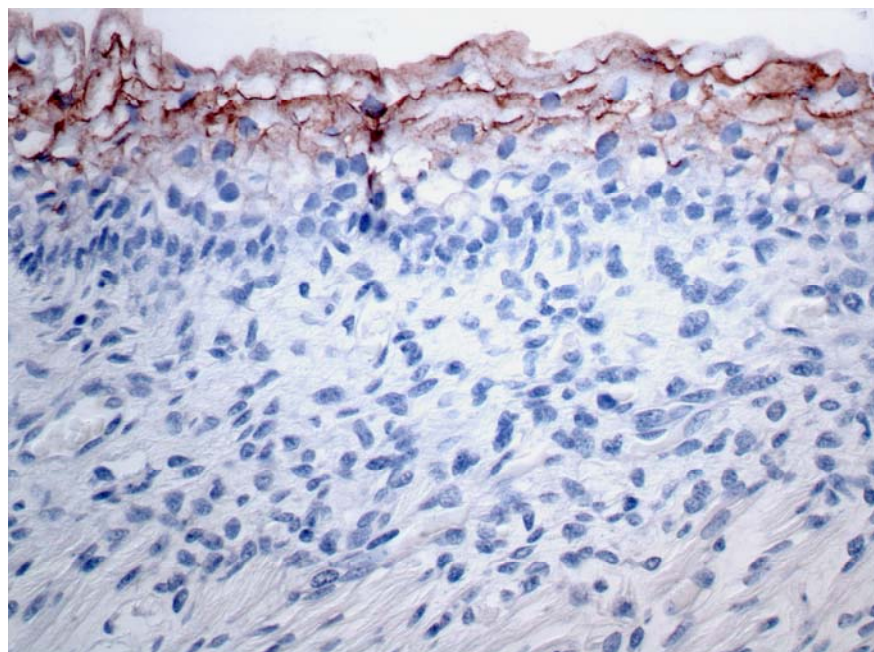
A tabela 7 demonstra o padrão de marcação para o epitélio respiratório e o epitélio da língua que apresentaram positividade para SPLUNC1.

**Tabela 7: Fetos que apresentaram positividade nos tecidos do palato e língua para o marcador SPLUNC1.**

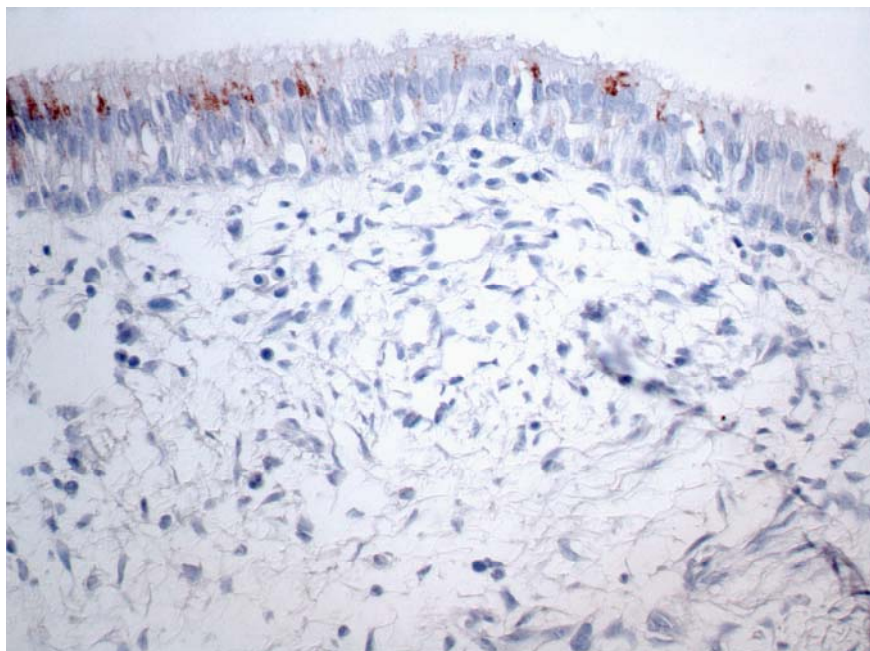
| <b>Fetos</b> | <b>Localização</b> | <b>Marcação Imunoistoquímica</b>                                 |
|--------------|--------------------|------------------------------------------------------------------|
| FT05         | Palato             | Nas células ciliadas do epitélio respiratório                    |
| FT08         | Língua             | No epitélio da língua                                            |
| FT11         | Palato             | Nas células ciliadas do epitélio respiratório.                   |
| FT12         | Língua             | No epitélio da língua                                            |
| FT18         | Palato             | Nas células ciliadas do epitélio respiratório                    |
| FT26         | Palato             | Positividade focal no epitélio respiratório                      |
| FT32         | Língua             | No epitélio da língua                                            |
| FT32         | Palato             | Positividade focal nas células ciliadas do epitélio respiratório |
| FT33         | Palato             | Nas células ciliadas do epitélio respiratório                    |



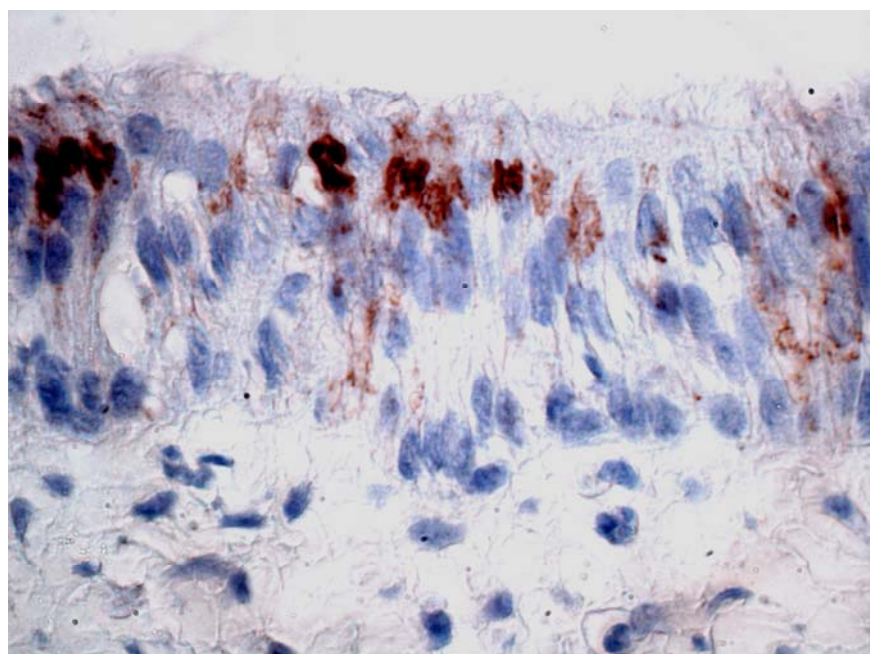
**Figura 24: FT-8 Epitélio da língua apresentando marcação positiva para SPLUNC1 com padrão de membrana (Imunoistoquímica. Aumento original 400x).**



**Figura 25: FT-12 Epitélio da língua apresentando marcação positiva para SPLUNC1 com padrão de membrana (Imunoistoquímica. Aumento original 400x).**



**Figura 26: FT-11 Região palatina. Marcação positiva para SPLUNC1 no epitélio respiratório cilíndrico ciliado pseudoestratificado (Imunoistoquímica. Aumento original 400x).**



**Figura 27: Maior aumento da figura 21 mostrando marcação positiva para SPLUNC1 no epitélio respiratório cilíndrico ciliado pseudoestratificado (Imunoistoquímica. Aumento original 1000x).**

## 6-DISCUSSÃO

As funções das proteínas da família PLUNC ainda não estão totalmente elucidadas, entretanto vários autores (Bingle & Craven, 2002; LeClair, 2003; Geetha *et al.*, 2003; Wheeler *et al.*, 2003; Bingle *et al.*, 2004; Bingle & Gorr, 2004; Geetha *et al.*, 2005; Chu *et al.*, 2007; Silva, 2009), sustentados principalmente pela sua semelhança com a BPI, acreditam que elas possam desempenhar funções no mecanismo de imunidade inata.

O tempo de VIU dos casos avaliados no presente estudo variou entre 12 e 25 semanas, sendo que a média de VIU foi de 19,20 semanas. Na literatura escrita em língua inglesa há somente um grupo de pesquisadores (Zhou *et al.*, 2006) que avaliaram a expressão de PLUNC em glândulas salivares de fetos humanos. Esses autores avaliaram apenas a expressão de SPLUNC1 em quatro fetos humanos normais, com idade entre 28-30 semanas de VIU.

Nenhuma das glândulas salivares maiores e menores avaliadas no presente estudo apresentaram positividade para os marcadores SPLUNC2A e SPLUNC2B. Segundo Vargas *et al.* (2008) e Silva (2009), a expressão de SPLUNC2 em glândulas salivares de adultos ocorre principalmente nas células serosas. Bingle *et al.* (2009) demonstraram que a expressão de SPLUNC2 em glândulas salivares de humanos adultos ocorre não somente nas células serosas, mas também no interior do ductos intralobulares e interlobulares das glândulas salivares maiores e nas semiluas serosas das glândulas salivares menores. Entretanto, na literatura de língua inglesa, não existem trabalhos que tenham avaliado a expressão de SPLUNC2 em glândulas salivares maiores e menores de fetos humanos. A ausência de expressão de SPLUNC2 nas glândulas salivares dos fetos humanos encontrada no nosso estudo pode estar associada a atividade enzimática dos grânulos secretores, a qual ocorre somente na primeira semana de vida. Além disso, a proteína PSP (homóloga do SPLUNC2 humano), expressa nas glândulas salivares maiores de roedores, inicia sua expressão apenas no período pós-natal (Redman & Field, 1993; Denny *et al.*, 1997; Ball *et al.*, 2003). Ferraris *et*

*al.* (2006), observaram a secreção de mucina em glândulas salivares maiores e menores antes do nascimento, no entanto os grânulos de zimógeno só começariam a ser liberados na etapa pós-natal.

LPLUNC1 é expressa nas células ductais das glândulas salivares maiores em pacientes adultos (Vargas *et al.*, 2008; Silva, 2009), porém não existem até o momento estudos mostrando sua expressão nas glândulas salivares de fetos humanos. Dentre as glândulas salivares avaliadas por Silva (2009), a expressão de LPLUNC1 foi detectada nos ductos salivares de glândulas parótidas, submandibulares e sublinguais em 42,22%, 51,06% e 63,88%, respectivamente. No nosso estudo, o anticorpo LPLUNC1 marcou o pólo apical das células epiteliais dos ductos estriados primitivos em duas amostras de glândula salivar maior de fetos humanos (ver tabela 6), as quais apresentavam-se nos estágios de morfodiferenciação canalicular e broto terminal. Vale destacar que essas duas amostras corresponderam a apenas 3,45% dos casos avaliados, logo, este achado precisa ser melhor investigado através de outras técnicas laboratoriais mais sensíveis, como a hibridização *in situ* e PCR.

A expressão de SPLUNC1 foi observada em 13 (50%) dos 26 fetos humanos avaliados (ver tabela 5). Zhou *et al.* (2006) avaliaram a expressão de 4 fetos humanos, entretanto os autores não informaram quantos fetos expressaram SPLUNC1. Zhou *et al.* (2006) detectaram a expressão de SPLUNC1 nas células serosas e mucosas das glândulas submandibulares dos fetos humanos, diferindo do nosso estudo, onde a expressão de SPLUNC1 nas glândulas submandibulares ocorreu principalmente nos plugues de mucina dos ductos estriados.

Zhou *et al.* (2006) evidenciaram uma forte expressão de SPLUNC1 na glândula parótida dos fetos humanos, entretanto nenhuma das sete parótidas avaliadas no nosso trabalho apresentaram positividade para SPLUNC1 ou qualquer outro marcador utilizado. Esse fato pode ser explicado pela diferença do tempo de VIU dos fetos que tiveram a parótida avaliada em nosso estudo (16-21 semanas de VIU) e o tempo de VIU dos fetos avaliados por Zhou *et al.* (2006), que variou entre 28 e 30 semanas. A produção de saliva na parótida ocorre entre a 25<sup>a</sup>



e 32ª semana de VIU (Martinez-Madriral *et al.*, 2007), o que pode explicar a não expressão de proteínas da família PLUNC na parótida dos fetos avaliados no presente estudo. O desenvolvimento lento da parótida deve ser considerado, pois apesar de ser a primeira glândula salivar a aparecer na VIU, a parótida somente iniciará a formação dos seus primeiros grânulos secretores após o nascimento (Redman & Sreebny, 1971; Redman & Field, 1993; Denny *et al.*, 1997; Ball *et al.*, 2003; Martinez-Madriral *et al.*, 2007).

A expressão de SPLUNC1 nas glândulas sublinguais e glândulas salivares menores de fetos humanos não havia sido avaliada previamente. Bingle *et al.* (2009), detectaram a expressão citoplasmática da proteína SPLUNC1 nos ácinos mucosos e nos plugues de mucina dos ductos das glândulas sublinguais e glândulas salivares menores de adultos. No nosso estudo, SPLUNC1 foi expressa principalmente no citoplasma das células mucosas dos túbulos mucosos primitivos nas glândulas sublinguais, porém, em um caso, o citoplasma das células mioepiteliais e ductais dos ácinos primitivos também apresentaram positividade para SPLUNC1. As glândulas salivares menores da região labial apresentaram marcação positiva tanto no citoplasma das células mucosas dos túbulos mucosos quanto nos plugues de mucina dos ductos estriados. As glândulas da região palatina e lingual apresentaram marcação positiva no citoplasma das células mucosas dos túbulos mucosos, entretanto um caso de glândula da região lingual expressou a proteína SPLUNC1 no citoplasma das células ductais dos ácinos primitivos. Desta forma, podemos afirmar, pioneiramente, que as glândulas sublinguais e as glândulas salivares menores da região labial, palatina e lingual expressam SPLUNC1 durante a VIU, entretanto são necessários novos estudos para se tentar descobrir a real função dessa proteína no período embrionário.

A expressão da proteína SPLUNC1 no epitélio das vias aéreas superiores de humanos adultos é bem conhecida (Geetha *et al.*, 2003; Wheeler *et al.*, 2003; Bingle & Gorr, 2004; Bingle *et al.*, 2005), entretanto a função dessa proteína ainda não está elucidada. Desta forma, tem-se tentado demonstrar a relação dessas proteínas dentro do sistema de defesa do hospedeiro frente aos

agentes agressores (Sung *et al.*, 2002; Ghafouri *et al.*, 2003; He *et al.*, 2005; Bingle *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2006; Chu *et al.*, 2007; Bingle *et al.*, 2007). Durante a avaliação das glândulas salivares menores da região palatina, observamos a marcação positiva para SPLUNC1 no citoplasma das células ciliadas do epitélio respiratório que se encontrava adjacente ao tecido glandular. LeClair *et al.* (2001), verificaram a expressão de proteína PLUNC no epitélio embrionário da nasofaringe de ratos. Zhou *et al.* (2006), observaram a expressão de SPLUNC1 no epitélio escamoso e colunar da região nasal, palatina, nasofaringe e traqueal de fetos humanos, entretanto estes autores não observaram a expressão de SPLUNC1 nos septos nasais dos fetos avaliados. Nossos achados são consistentes, visto que mais de 60% dos casos avaliados na região de palato expressaram SPLUNC1 nas células respiratórias, dessa forma, faz-se necessário a realização de novos estudos para avaliar a expressão de SPLUNC1 no epitélio respiratório humano durante o período embrionário, buscando elucidar a função de SPLUNC1 durante esta etapa do desenvolvimento humano.

Curiosamente, durante a avaliação das glândulas salivares menores da região lingual, detectamos a expressão de SPLUNC1 no epitélio escamoso da superfície da língua. Zhou *et al.* (2006) não observaram a expressão de SPLUNC1 em amostras de língua de fetos humanos. Na verdade, este tipo de expressão nunca havia sido observado nem em fetos ou adultos humanos. No entanto, LeClair *et al.* (2004) demonstraram que um membro da família PLUNC exclusivo dos camundongos, denominado de SPLUNC5 é expresso exclusivamente no epitélio intrapapilar da superfície dorsal da língua. A expressão de proteínas da família PLUNC em humanos não parece mais ser uma exclusividade de tecidos do trato aéreo e glândulas salivares. Zhou *et al.* (2006), observaram a expressão de SPLUNC1 no tecido adiposo, digestivo e ocular de fetos humanos. Shiba *et al.* (2005) e Bartlett *et al.* (2008) verificaram a presença da proteína PLUNC em queratinócitos gengivais humanos e em células de linhagem hematopoiética, respectivamente. Desta forma, podemos hipotetizar que SPLUNC1 tem a função de proteger as superfícies epiteliais da língua dos fetos humanos em

desenvolvimento, e por isso novas investigações devem ser conduzidas para determinar o papel da proteína SPLUNC1 nos queratinócitos linguais de fetos humanos.

O estágio de morfodiferenciação das glândulas salivares parece estar relacionado com o início da expressão de SPLUNC1 nas glândulas salivares de fetos humanos. Todas as amostras positivas para SPLUNC1 apresentaram predominância dos estágios de morfodiferenciação mais avançados (canalicular e broto terminal). Segundo Tucker (2007), as glândulas nesses estágios, apesar de apresentarem uma boa diferenciação, só se tornarão completas no período pós-natal. Segundo nossos resultados, as glândulas submandibulares iniciam sua expressão no estágio canalicular de morfodiferenciação. Entretanto, é difícil explicar como nove amostras de glândulas submandibulares avaliadas não expressaram SPLUNC1, sendo que estas apresentaram predominância pelo estágio canalicular (n=8) e broto terminal (n=1) de morfodiferenciação. As glândulas sublinguais e glândulas salivares menores da região labial, palatina e lingual parecem iniciar a expressão de SPLUNC1 no estágio broto terminal de morfodiferenciação. Entretanto seria difícil explicar a ausência de expressão de SPLUNC1 nas outras cinco amostras onde houve predomínio do padrão broto terminal. É importante ressaltar que o material utilizado no presente estudo é proveniente de um arquivo composto de blocos parafinados. Deste modo, os tecidos podem ter sofrido autólise no ato da coleta ou não foram adequadamente fixados em formol tamponado, o que pode ter interferido na recuperação antigênica destas proteínas e conseqüentemente em alguns resultados do presente estudo.

Em conclusão, este é o primeiro trabalho na literatura que estudou amplamente a expressão das proteínas da família PLUNC (SPLUNC1, SPLUNC2, LPLUNC1) em glândulas salivares maiores e menores, epitélio da língua e palato de fetos humanos. A proteína SPLUNC1 inicia sua expressão na VIU e seu início está relacionado com os estágios de morfodiferenciação mais avançados (canalicular e broto terminal) das glândulas salivares maiores e menores. As



células ciliadas do epitélio respiratório também expressaram a proteína SPLUNC1 na VIU, assim como, pioneiramente, foi observada a expressão de SPLUNC1 no epitélio escamoso de superfície da língua dos fetos. A proteína SPLUNC2 não inicia sua expressão nas glândulas salivares no período fetal, enquanto que a proteína LPLUNC1 foi expressa em apenas dois casos estudados, logo precisamos investigar melhor sua expressão na VIU. Assim sendo, novos estudos com métodos mais sensíveis devem ser realizados para avaliar e quantificar a expressão de SPLUNC1 e LPLUNC1 em glândulas salivares maiores e menores, epitélio da língua e palato de fetos humanos, visando melhor entender a função destas proteínas na vida intra-uterina.

## **7-CONCLUSÕES:**

**1-** A proteína SPLUNC1 é expressa durante a VIU principalmente no citoplasma das células mucosas dos túbulos mucosos, nos plugues de mucina dos ductos estriados e no citoplasma de células mioepiteliais e ductais primitivas das glândulas salivares maiores e menores de fetos humanos em desenvolvimento.

**2-** O epitélio respiratório da região palatina e o epitélio escamoso superficial da língua de fetos humanos em desenvolvimento expressa a proteína SPLUNC1.

**3-** Os estágios de morfodiferenciação das glândulas salivares influenciam a expressão de SPLUNC1. A expressão dessa proteína durante a VIU inicia nas glândulas salivares em estágio de morfodiferenciação avançado (estágio canalicular e broto terminal).

**4-** A proteína SPLUNC2 não é expressa nas glândulas salivares de fetos humanos, logo sua expressão ocorre apenas no período pós-natal como já evidenciado em outras pesquisas.

**5-** Apenas dois casos foram positivos para a proteína LPLUNC1 (células ductais) em nosso estudo. Portanto, a expressão de LPLUNC1 durante a VIU deve ser estudada com técnicas laboratoriais mais sensíveis.

**6-** As glândulas parótidas não foram positivas para nenhuma das proteínas da família PLUNC avaliadas em nosso estudo, sugerindo que a expressão de PLUNC na parótida ocorra apenas no período pós-natal devido seu desenvolvimento mais lento e sua secreção predominantemente serosa. Entretanto, as glândulas submandibulares, sublinguais e glândulas salivares menores apresentaram positividade para SPLUNC1 na VIU devido sua secreção mucosa.

## REFERÊNCIAS

- 1- Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Imunidade Inata. *In: Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Imunologia celular e molecular. 4. ed. Revinter: Rio de Janeiro; 2002. p. 270-290.*
- 2- Abbas AK. Doenças da Imunidade. *In: Kumar V, Abbas AK, Fausto N. Robbins and Cotran: Patologia Estrutural e Funcional. 7. ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro; 2005. p. 193-267.*
- 3- Ball WD, Mirels L, Hand AR. Psp and Smgb: a model for developmental and functional regulation in the rat major salivary glands. *Biochem Soc Trans. 2003; 31(4): 777-80.*
- 4- Balogh K, Pantanowitz L. Mouth, Nose, and Paranasal Sinuses *In: Mills SE. Histology for Pathologists. 3 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007. p. 445-70.*
- 5- Bartlett JA, Hicks BJ, Schlomann JM, Ramachandran S, Nauseef WM, McCray PB Jr. PLUNC is a secreted product of neutrophil granules. *J Leukoc Biol. 2008; 83(5): 1201-6.*
- 6- Bender PL. Genetics of cleft lip and palate. *J Pediatr Nurs. 2000; 15(4): 422-49.*
- 7- Bingle CD, Bingle L. Characterization of the human PLUNC gene, a gene product with an upper airways and nasopharyngeal restricted expression pattern. *Biochim Biophys Acta. 2000; 1493(3): 363-7.*
- 8- Bingle CD, Craven J. PLUNC: A novel family of candidate host defense proteins expressed in the upper airways and nasopharynx. *Hum Mol Genet. 2002; 11(8): 932-943.*
- 9- Bingle CD, Craven CJ. Comparative analysis of the PLUNC (palate, lung and nasal epithelium clone) protein families. *Biochem Soc Trans. 2003; 31(Pt 4): 806-809.*
- 10- Bingle CD, Gorr SU. Host defense in oral and airway epithelia: chromosome 20 contributes a new protein family. *Int J Biochem Cell Biol. 2004; 36(11): 2144-52.*

- 11-** Bingle CD, LeClair EE, Havard S, Bingle L, Gillingham, Craven CJ. Phylogenetic and evolutionary analysis of the PLUNC gene family. *Protein Sci.* 2004; 13(2): 422-430.
- 12-** Bingle L, Cross SS, High AS, Wallace WA, Devine DA, Havard S *et al.* SPLUNC1 (PLUNC) is expressed in glandular tissues of the respiratory tract and in lung tumours with a glandular phenotype. *J Pathol.* 2005; 205(4): 491-7.
- 13-** Bingle L, Barnes FA, Cross SS, Rass ID, Wallace WA, Campos MA *et al.* Differential epithelial expression of the putative innate immune molecule SPLUNC1 in cystic fibrosis. *Respir Res.* 2007; 8: 79.
- 14-** Bingle L, Barnes FA, Lunn H, Musa M, Webster S, Douglas CW *et al.* Characterisation and expression of SPLUNC2, the human orthologue of rodent parotid secretory protein. *Histochem Cell Biol.* 2009; 132(3): 339-49.
- 15-** Bradshaw J. Cationic antimicrobial peptides: issues for potential clinical use. *Bio Drugs.* 2003; 17(4): 233-240.
- 16-** Campos MA, Abreu AR, Nlend MC, Cobas MA, Conner GE, Whitney PL. Purification and characterization of PLUNC from human tracheobronchial secretions. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2004; 30(2): 184-92.
- 17-** Chu HW, Thaikootathil J, Rino JG, Zhang G, Wu Q, Moss T *et al.* Function and regulation of SPLUNC1 protein in Mycoplasma infection and allergic inflammation. *J Immunol.* 2007; 179(6): 3995-4002.
- 18-** Cole AM, Liao HI, Stuchlik O, Tilan J, Pohl J, Ganz T. Cationic polypeptides are required for antibacterial activity of human airway fluid. *J Immunol.* 2002; 169(12): 6985-6991.
- 19-** Dale AC. Glândulas Salivares. *In:* Ten Cate AR. *Histologia Bucal: Desenvolvimento, Estrutura e Função.* 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001. p. 296-321.
- 20-** Denny PC, Ball WD, Redman RS. Salivary glands: a paradigm for diversity of gland development. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1997; 8(1): 51-75.
- 21-** Edgerton M, Koshlukova SE. Salivary histatin 5 and similarities to the other antimicrobial proteins in human saliva. *Adv Dent Res.* 2000; 14: 16-21.

- 22-** Ferraris MEG, Muñoz AC, Arriaga A. Glândulas salivares. *In:* Ferraris MEG, Muñoz AC. Histologia e Embriologia Bucodental. 2 ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro; 2006. p. 137-169.
- 23-** Ferraris MEG, Muñoz AC. Embriologia Especial Bucomaxilofacial. *In:* Ferraris MEG, Muñoz AC. Histologia e Embriologia Bucodental. 2 ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro; 2006. p. 39-71.
- 24-** Ganz T. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat Rev immunol.* 2003; 3(9): 710-720.
- 25-** Geetha C, Venkatesh SG, Dunn BH, Gorr SU. Expression and anti-bacterial activity of human parotid secretory protein (PSP). *Biochem Soc Trans.* 2003; 31(Pt 4): 815-8.
- 26-** Geetha C, Venkatish SG, Bingle L, Bingle CD, Gorr SU. Design and validation of anti-inflammatory peptides from human parotid secretory protein. *J Dent Res.* 2005; 84(2): 149-153.
- 27-** Ghafouri B, Kihlström E, Ståhlbom B, Tagesson C, Lindahl M. PLUNC (palate, lung and nasal epithelial clone) proteins in human nasal lavage fluid. *Biochem Soc Trans.* 2003; 31(Pt 4): 810-4.
- 28-** Gorr SU, Sotsky JB, Shelar AP, Demuth DR. Design of bacteria-agglutinating peptides derived from parotid secretory protein, a member of the bactericidal/permeability increasing-like protein family. *Peptides.* 2008; 29(12): 2118-27.
- 29-** Guo T, Rudnick PA, Wang W, Lee CS, Devoe DL, Balgley BM. Characterization of the human salivary proteome by capillary isoelectric focusing/nanoreversed-phase liquid chromatography coupled with ESI-tandem MS. *J Proteome Res.* 2006; 5(6): 1469-78.
- 30-** He Y, Zhou G, Zhai Y, Dong X, Lv L, He F *et al.* Association of PLUNC gene polymorphisms with susceptibility to nasopharyngeal carcinoma in a Chinese population. *J Med Genet.* 2005; 42(2): 172-6.
- 31-** Hoffmann JA, Kafatos FC, Janeway CA, Ezekowitz RAB. Phylogenetic perspective in innate immunity. *Science.* 1999; 284: 1313-1318.

- 32-** Janeway CA, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol.* 2002; 20: 197-216.
- 33-** Junqueira LC, Carneiro J. Órgãos associados ao trato digestivo. *In:* Junqueira LC, Carneiro J. *Histologia Básica.* 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004. p. 317-320.
- 34-** Kim CH, Kim K, Kim HJ, Kim JK, Lee JG, Yoon JH. Expression and regulation of PLUNC in human nasal epithelium. *Acta Otolaryngol.* 2006; 126(10): 1073-8.
- 35-** Kumar V, Abbas AK, Fausto N. Inflamação Aguda e Crônica. *In:* Kumar V, Abbas AK, Fausto N. *Robbins and Cotran: Patologia Estrutural e Funcional.* 7. ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro; 2005. p. 47-86.
- 36-** Larsen K, Madsen LB, Bendixen C. Porcine SLPUNC1: Molecular cloning characterization and expression analysis. *Biochem Biophys Acta.* 2005; 1727(3): 220-226.
- 37-** LeClair EE, Nguyen L, Bingle L, MacGowan A, Singleton V, Ward SJ *et al.* Genomic organization of the mouse PLUNC gene and expression in the developing airways and thymus. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001; 284(3): 792-797.
- 38-** LeClair EE. Four BPI (bactericidal/permeability-increasing protein)-like genes expressed in the mouse nasal, oral, airway and digestive epithelia. *Biochem Soc Trans.* 2003; 31(Pt 4): 801-805.
- 39-** LeClair EE, Nomellini V, Bahena M, Singleton V, Bingle L, Craven CJ *et al.* Cloning and expression of a mouse member of the PLUNC protein family exclusively expressed in tongue epithelium. *Genomics.* 2004; 83(4): 658-66.
- 40-** Lourenço SV, Lima DM, Uyekita SH, Schultz R, de Brito T. Expression of beta-1 integrin in human developing salivary glands and its parallel relation with maturation markers: in situ hybridisation and immunofluorescence study. *Arch Oral Biol.* 2007; 52(11): 1064-71.

- 41-** Martinez-Madrigal F, Bosq J, Casiraghi O. Major Salivary Glands. *In*: Mills SE. Histology for Pathologists. 3 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007. p. 445-70.
- 42-** Moore KL, Persaud TVN. Aparelho Faríngeo. *In*: Moore KL, Persaud TVN. Embriologia Clínica. 7. ed. Elsevier: Rio de Janeiro; 2004. p. 225-264.
- 43-** Patel VN, Rebustini IT, Hoffman MP. Salivary gland branching morphogenesis. *Differentiation*. 2006; 74(7): 349-64.
- 44-** Potter EL, Craig JM. Pathology of the Fetus and Infant. 3. ed. Chicago: Year Book Medical Publishers, 1975.
- 45-** Ramachandran P, Boontheung P, Xie Y, Sondej M, Wong DT, Loo JA. Identification of N-linked glycoproteins in human saliva by glycoprotein capture and mass spectrometry. *J Proteome Res*. 2006; 5(6): 1493-503.
- 46-** Redman RS, Sreebny LM. Morphologic and biochemical observations on the development of the rat parotid gland. *Dev Biol*. 1971; 25: 248-279.
- 47-** Redman RS, Field RB. Chronology of peroxidase activity in the developing rat parotid gland. *Anat Rec*. 1993; 235: 611-621.
- 48-** Rocha LA, Vargas PA, Silva LF, Leon JE, Santos AB, Hiemstra PS *et al*. Expression of secretory leukocyte proteinase inhibitor in the submandibular glands of AIDS patients. *Oral Dis*. 2008; 14(1): 82-8.
- 49-** Sadler, TW. Embriologia Médica: Langman. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. p. 241-265.
- 50-** Shiba H, Venkatesh SG, Gorr SU, Barbieri G, Kurihara H, Kinane DF. Parotid secretory protein is expressed and inducible in human gingival keratinocytes. *J Periodontal Res*. 2005; 40(2): 153-7.
- 51-** Silva AA. Expressão das proteínas da família PLUNC nas glândulas salivares maiores de pacientes autopsiados com AIDS em fase avançada e sem AIDS [tese]. Piracicaba: UNICAMP/FOP; 2009.
- 52-** Sung YK, Moon C, Yoo JY, Moon C, Pearse D, Pevsner J *et al*. PLUNC, a member of the secretory gland protein family, is up-regulated in nasal respiratory epithelium after olfactory bulbectomy. *J Biol Chem*. 2002; 277(15): 12762-12769.

- 53-** Tenovou J. Antimicrobial function of human saliva – how important is it for oral health? *Acta Odontol Scand.* 1998; 56(5): 250-256.
- 54-** Tucker AS. Salivary gland development. *Semin Cell Dev Biol.* 2007; 18(2): 237-44.
- 55-** Vargas PA, Speight PM, Bingle CD, Barrett AW, Bingle L. Expression of PLUNC family members in benign and malignant salivary gland tumours. *Oral Dis.* 2008; 14(7): 613-9.
- 56-** Vitorino R, Lobo MJ, Ferrer-Correia AJ, Dubin JR, Tomer KB, Domingues PM *et al.* Identification of human whole saliva protein components using proteomics. *Proteomics.* 2004; 4(4): 1109-15.
- 57-** Walz A, Stuhler K, Wattenberg A, Hawranke E, Meyer HE, Schmalz G *et al.* Proteome analysis of glandular parotid and submandibular–sublingual saliva in comparison to whole human saliva by two-dimensional gel electrophoresis. *Proteomics.* 2006; 6: 1631–1639
- 58-** Weinberg A, Krisanaprokorkit S, Dali BA. Epithelial antimicrobial peptides: review and significance for oral applications. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1998; 9(4): 399-414.
- 59-** Weston WM, LeClair EE, Trzyna W, McHunh KM, Nugent P, Lafferty CM *et al.* Differential display identification of plunc, a novel gene expressed in embryonic palate, nasal epithelium and adult lung. *J Biol Chem.* 1999; 274(19): 13698-703.
- 60-** Wheeler TT, Hood K, Oden K, McCracken J, Morris CA. Bovine parotid secretory protein: structure, expression and relatedness to other BPI (bactericidal/permeability-increasing protein)-like proteins. *Biochem Soc Trans.* 2003; 31(Pt 4): 781-784.
- 61-** Zhou HD, Fan SQ, Zhao J, Huang DH, Zhou M, Liu HY *et al.* Tissue distribution of the secretory protein, SPLUNC1, in the human fetus. *Histochem Cell Biol.* 2006; 125(3): 315-324.



## ANEXO

Comitê de Ética em Pesquisa - Certificado



**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA  
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**



### CERTIFICADO

O Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP certifica que o projeto de pesquisa "**Avaliação da expressão de PLUNC em glândulas salivares maiores e menores de fetos humanos**", protocolo nº 114/2009, dos pesquisadores Daniel Berretta Moreira Alves, Pablo Agustin Vargas e Silvia Vanessa Lourenço, satisfaz as exigências do Conselho Nacional de Saúde - Ministério da Saúde para as pesquisas em seres humanos e foi aprovado por este comitê em 18/09/2009.

The Ethics Committee in Research of the School of Dentistry of Piracicaba - State University of Campinas, certify that the project "**Evaluation of the PLUNC expression in major and minor salivary glands of human fetus**", register number 114/2009, of Daniel Berretta Moreira Alves, Pablo Agustin Vargas and Silvia Vanessa Lourenço, comply with the recommendations of the National Health Council - Ministry of Health of Brazil for research in human subjects and therefore was approved by this committee at .

**Prof. Dr. Pablo Agustin Vargas**  
Secretário  
CEP/FOP/UNICAMP

**Prof. Dr. Jacks Jorge Junior**  
Coordenador  
CEP/FOP/UNICAMP

Nota: O título do protocolo aparece como fornecido pelos pesquisadores, sem qualquer edição.  
Notice: The title of the project appears as provided by the authors, without editing.