

Componentes das imunidades inata e adaptativa presentes na saliva humana

Lia MIZOBE-ONO^a, João Luiz Pereira de ARAÚJO^b,

Maria Cristina DOS-SANTOS^c

^a*Mestre em Patologia Tropical, FCS, UFAM, Fundação Centro de Oncologia do Amazonas,
69077-000 Manaus - AM, Brasil*

^b*Mestrando em Patologia Tropical, FCS, UFAM, 69077-000 Manaus - AM, Brasil*

^c*Doutora em Imunologia pela Universidade de São Paulo,*

Instituto de Ciências Biológicas, UFAM, 69077-000 Manaus - AM, Brasil

Mizobe-Ono L, Araújo JLP, Dos-Santos MC. Components of the innate and adaptive immunity present in human saliva. Rev Odontol UNESP. 2006; 35(4): 253-261.

Resumo: A cavidade bucal é a porta principal de entrada de patógenos para o corpo humano. No entanto, devido a um complexo mecanismo de defesa, os inúmeros agentes infecciosos que colonizam ou penetram a cavidade bucal não ocasionam patologias. A saliva, além de desempenhar as funções de hidratação e lubrificação dos tecidos da cavidade bucal, atua diretamente na regulação da microbiota e na proteção contra microrganismos. A função de proteção é desempenhada por componentes celulares e moleculares pertencentes às imunidades inata e adaptativa que atuam sobre bactérias, fungos e vírus. As proteínas da imunidade inata constituem a primeira linha de defesa do organismo, e as imunoglobulinas, secretadas pelos linfócitos B1 da imunidade inata e pelos linfócitos B da imunidade adaptativa, potencializam esse mecanismo protetor. Nesta revisão foram destacados os principais componentes celulares e moleculares pertencentes ao Sistema Imune Inato e ao Sistema Imune Adaptativo que atuam na proteção e na manutenção da homeostasia da cavidade bucal.

Palavras-chave: *Imunidade inata; imunidade adaptativa; proteínas salivares; saliva; defesa.*

Abstract: The oral cavity is the main pathway through which pathogens enter the human body. However, as a result of a complex defense mechanism, the numerous infectious agents that enter and colonize the oral cavity do not cause pathologies. Besides moisturizing and lubricating the oral cavity tissues, the saliva acts directly in the regulation of the microbiota and in the protection against microorganisms. The protective function is performed by the cellular and molecular components of the innate and adaptive immunity, which act against bacteria, fungi and viruses. The proteins of the innate immunity are the organism first line of defense and the immunoglobulin, which are secreted by the B1 lymphocytes of the innate immunity and B lymphocytes of the adaptive immunity, boost the protective mechanism. In this review we emphasize the main cellular and molecular components that belong to the Innate Immune System and to the Adaptive Immune System, which act in the protection and the maintenance of the oral cavity homeostasis.

Keywords: *Innate immunity; adaptive immunity; salivary proteins; saliva; defense.*

Introdução

A cavidade bucal é a principal porta de entrada de agentes infecciosos para o organismo. Existem cerca de 600 espécies de bactérias colonizando a cavidade bucal^{8,44}, além de vírus⁵⁵ e fungos^{35,47,68,73}. Alguns desses microrganismos podem causar infecções locais e sistêmicas³⁵. Porém, quando penetram na cavidade bucal, enfrentam a primeira barreira: a saliva, que apresenta células e moléculas na sua composição, pertencentes às imunidades inata e adaptativa, que atuam sobre microrganismos^{35,36}. Nesta revisão, foram destacados os principais componentes celulares e moleculares, pertencentes ao Sistema Imune Inato e ao Sistema Imune Adaptativo, que atuam na proteção e na manutenção da homeostasia da cavidade bucal, cuja saúde reflete o estado geral do indivíduo⁶⁶.

Sistema imunológico

A resposta imunológica nos vertebrados superiores é realizada por componentes pertencentes aos Sistemas Imunes Inato (SII) e Adaptativo (SIA)³⁹. O SII constitui a primordial defesa do organismo contra agentes infecciosos, pois reconhece rapidamente o patógeno, seus produtos tóxicos ou o tecido danificado e sinaliza a presença “do perigo” direcionando as células do SIA para uma resposta específica contra o invasor^{4,5,58}. O SIA, do ponto de vista evolutivo, é mais recente que o SII. Registros mostram que o SIA surgiu há cerca de 450 milhões de anos nos vertebrados mandibulados, tais como peixes cartilagosos e ósseos^{23,27,73}.

Os receptores do SII são formados na linhagem germinativa. As células do SII não se dividem, não formam clones e não produzem células de memória. No entanto, os receptores para antígenos das células do SIA (TCR - linfócitos T e o BCR - linfócitos B) são formados na linhagem somática e podem sofrer hipermutações, que aumentam a afinidade pelo determinante antigênico. A resposta do SIA, contrária à do SII, torna-se mais eficiente a cada encontro sucessivo com o mesmo patógeno, devido à formação de células de memória^{4,25,58}.

Apesar de muitos autores citarem a inexistência de doenças alérgicas e auto-imunes induzidas pelo SII²⁵, trabalhos recentes demonstram que os receptores do tipo Toll - TLR-3, TLR-7, TLR-8 e TLR-9 - podem desencadear doença auto-imune por reconhecerem DNA de células apoptóticas próprias quando presente em altas concentrações^{6,39}.

Saliva

As glândulas salivares maiores (parótidas, submandibular e sublingual) são responsáveis pela produção e secreção de 70 a 80% da saliva. As glândulas salivares menores ou glândulas acessórias são inúmeras. Distribuídas pela cavidade bucal, secretam de 10 a 20% da saliva^{63,65}.

Cerca de 99% da composição da saliva é água. O remanescente 1% consiste na maior parte, de macromoléculas, moléculas orgânicas pequenas e componentes inorgânicos^{2,54,64}.

A saliva forma uma barreira que atua na manutenção da integridade, da hidratação e da lubrificação dos tecidos da cavidade bucal. Além disso, a saliva tem ação remineralizante e é, também, essencial para a alimentação^{30,36,40,43,57,63}. A função de defesa da saliva é desempenhada pelos componentes do SII e SIA que são abordados, em detalhe, nesta revisão.

Componentes celulares das imunidades inata e adaptativa na saliva

Células: esses componentes foram pouco estudados na saliva. Porém, há relatos que demonstram a existência de leucócitos, derivados das glândulas salivares, do fluido crevicular, das tonsilas, da mucosa bucal, das secreções bronco-pulmonares e da orofaringe³. Dos leucócitos salivares, os neutrófilos, representantes do SII, foram os mais estudados. Esses polimorfonucleares (PMN) entram nos tecidos periodontais^{3,60,68} provenientes do sangue periférico e migram constantemente para a cavidade bucal, por meio do sulco gengival, onde estão envolvidos na prevenção de doenças periodontais e bucais. Os PMN expressam baixa quantidade de proteína CD31 em suas membranas. A CD31 facilita o retorno dos neutrófilos para a corrente sanguínea, e sua baixa expressão contribui para o acúmulo desses fagócitos no local infectado e, conseqüentemente, para o aumento de sua eficácia no combate às bactérias e a outros patógenos bucais⁶⁰.

Na saliva, em condições normais, não são encontrados os linfócitos T-citotóxicos³⁶ da imunidade adaptativa. No entanto, são encontrados NK (SII) e linfócitos T CD4 e B do SIA (manuscrito em preparação).

As células presentes na saliva podem atuar como marcadores biológicos para doenças. Por exemplo: o número de leucócitos salivares foi diretamente relacionado com a gengivite³. Outros trabalhos mostram que indivíduos com deficiência de PMN na cavidade bucal desenvolvem doenças periodontais graves, ulcerações e infecções bucais. Mucosites e infecções na cavidade bucal foram mais frequentes em pacientes com carcinomas, que apresentam neutropenia após quimioterapia⁶⁸.

Componentes moleculares da imunidade inata na saliva

Fosfato, bicarbonato e proteínas (sialina): esses componentes fazem parte do sistema-tampão da saliva, que protege a cavidade bucal, por manter neutro o pH salivar, pois alguns patógenos necessitam de pH específico para o seu crescimento e colonização; e os microrganismos do

biofilme dental produzem ácidos a partir de açúcares que levam à desmineralização do esmalte dental, favorecendo o desenvolvimento da doença cárie, causada principalmente pelo gênero *Streptococcus* sp.⁶³

Lactoferrina é uma glicoproteína com atividade quelante, ávida por ferro, encontrada na superfície da mucosa, dentro de grânulos de PMN e em secreções como lágrimas, leite, fluido seminal e saliva. Considerada uma proteína multifuncional, apresenta atividade bacteriostática, bactericida, fungicida, antiviral, antiparasítica, antiinflamatória e imunomoduladora^{15,36,37,46,51}. A atividade bacteriostática foi comprovada sobre estreptococos, estafilococos, enterococos e bactérias Gram-negativas, pois atua seqüestrando os íons de ferro e, com isso, privando as bactérias desse nutriente, que é essencial para o seu crescimento¹. Desempenha ação bactericida, ferro-independente, por ligar-se diretamente à parede de bactérias¹⁵. A adesão do *Streptococcus mutans* sobre a hidroxiapatita é inibida, assim como o consumo de glicose e a síntese de ácido láctico. A lactoferrina age, também, agregando bactérias, ativando células fagocíticas^{15,64} e inibindo diretamente a replicação de ampla variedade de vírus. A infecção de células do hospedeiro é prevenida pela ligação da lactoferrina com as partículas virais. Essa ação foi observada sobre o rotavírus, o vírus da hepatite C, o da pólio e o do herpes simples. A lactoferrina pode, ainda, se ligar a moléculas (presentes na superfície de membranas de células do hospedeiro) que os vírus utilizam como receptores ou co-receptores de entrada para a infecção¹⁵. A sua atividade fungicida foi observada sobre *Candida albicans* e *C. krusei*³⁷. Atua, ainda, modulando o crescimento do fungo *C. albicans* na cavidade bucal⁴⁵. A lactoferrina exibe, in vitro, atividade antiinflamatória⁴⁵. Vários domínios foram encontrados dentro de sua cadeia polipeptídica, os quais apresentam atividade antimicrobiana. Um dos domínios é a lactoferricina, resíduo peptídico catiônico, com 40 aminoácidos da região N-terminal, o qual é liberado após clivagem combinada da pepsina e tripsina e apresenta atividade bactericida de amplo espectro^{20,36}. Um outro domínio da lactoferrina se liga à aglutinina salivar. Isso sugere que ambas as proteínas podem atuar juntas na eliminação de microrganismos³⁶.

Lisozima: enzima encontrada em vários fluidos corpóreos, como a saliva, as lágrimas, o muco brônquico e o suor. A atividade antimicrobiana é bem conhecida. Atua catalisando a hidrólise de polissacarídeos da parede celular causando a lise das bactérias devido às condições hiposmóticas da saliva ou pela ação de outros componentes salivares antimicrobianos. Quando presente em altas concentrações na saliva, tem a capacidade de degradar as paredes das células bacterianas pela atividade da muramidase, causando a lise da camada peptidoglicana^{35,36}. Outra atividade bactericida – a não-enzimática – que induz a ativação de autolisinas bacterianas foi também descrita para lisozima³⁵. Esta enzima exibe atividade bactericida mesmo após inativação pelo

calor, provavelmente por sua característica catiônica³⁶. Assim como a lactoferrina, a lisozima atua modulando o crescimento da população de espécies fúngicas do gênero *Candida* sp.⁴⁵. A lactoferrina e a lisozima inibem a adesão das bactérias na hidroxiapatita recoberta pela saliva. A lisozima e a peroxidase salivar impedem a ingestão de glicose pelas bactérias⁶⁴.

A **atividade peroxidase salivar** é derivada de duas fontes: da **lactoperoxidase** (HS-LPO) e da **mieloperoxidase**. A lactoperoxidase é sintetizada e secretada pelas glândulas salivares, e a mieloperoxidase é encontrada nos PMN e apresenta ação antimicrobiana^{35,62}. As peroxidases salivares catalisam a formação de compostos bactericidas; por exemplo: o hipotiocianato, que é derivado da peroxidação do tiocianato³⁵. A peroxidase salivar também contribui para a diminuição do crescimento bacteriano, pois previne o acúmulo de lisina e ácido glutâmico (componentes essenciais ao crescimento de bactérias), impede o transporte de aminoácidos bacterianos e lisa a parede celular apresentando, portanto, ação bactericida^{52,64}.

Mucina: proteína produzida pelo glicocálix das células, forma um manto pegajoso e lubrificante que age como uma barreira físico-química do SII, auxiliando no aprisionamento de patógenos ou de suas substâncias, na inibição do crescimento ou na lise desses microrganismos^{1,35}. As mucinas previnem a aderência e a colonização bacteriana⁵⁴. Todas as superfícies mucosas do corpo são recobertas por essa barreira⁵⁶. As mucinas protegem os tecidos moles dos traumas físicos e das mudanças térmicas^{54,57}; lubrificam as superfícies da mucosa bucal e são importantes no controle de sua permeabilidade^{30,54,57}. Na saliva existem duas formas de mucinas: a MG1 de alto peso molecular (10-30 MDa), codificada pelo gene MUC5B, e a MG2 de baixo peso molecular (~130 kDa), transcrita do gene MUC7, a qual possui pelo menos duas glicofomas - MG2a e MG2b^{7,35,36,71}. Atualmente, a MG1 e a MG2 foram designadas como MUC5B e MUC7, respectivamente. Das proteínas totais salivares, as mucinas são encontradas em maiores concentrações – cerca de 20 a 30%. São caracterizadas pela abundância de carboidratos, ligados covalentemente às cadeias laterais da estrutura polipeptídica, tornando a conformação da molécula estendida. Cerca de 60% do peso molecular da MUC7 e 80% da MUC5B são constituídos por carboidratos^{36,48}. A MUC7 difere da mucina de alto peso molecular em estrutura, localização e função. A MUC5B tem forma alongada, é de grande dimensão e recoberta com resíduos de açúcar hidrofóbico. Essa estrutura molecular é a responsável pelas características de viscosidade e elasticidade da MUC5B. Já a MUC7 é uma proteína monomérica com cadeias laterais curtas de oligossacarídeo³⁶, a qual apresenta alta atividade de agregação bacteriana quando comparada com a de alto peso molecular⁴⁸, e se liga à ampla variedade de espécies bacterianas, inclusive *Streptococcus mutans*³⁶. A MUC7

apresenta um domínio histidina-similes (Hsn), o que sugere ação antimicrobiana na cavidade bucal, além do exercício de suas funções inerentes, tais como: lubrificação, revestimento de tecido, digestão e interação com microrganismos²¹. Ambas as mucinas, MUC5B e MUC7, atuam na proteção da cavidade bucal contra a infecção por vírus³⁶.

Aglutinina é uma proteína altamente glicosilada, com peso molecular de aproximadamente 340 kDa, sintetizada nas células serosas das glândulas submandibulares, sublinguais e parótidas. Semelhante à MUC7, a aglutinina salivar se liga a ampla variedade de microrganismos, tais como: *Streptococcus mutans*, *S. salivarius* e *S. sanguis*. Essa glicoproteína é muito similar, se não idêntica, à gp-340 encontrada no pulmão que se une à proteína surfactante D (SP-D). Essa junção favorece a fagocitose e a conseqüente morte de microrganismos pelos neutrófilos e macrófagos^{35,36}.

CD14 - atua como **Receptor de Reconhecimento de Padrões**, na Imunidade Inata, para alguns componentes bacterianos. É uma glicoproteína ancorada na membrana com a porção glicosilfosfatidilinositol, tem peso molecular de 55 kDa e é expressa principalmente pelos monócitos, macrófagos e por vários outros tipos celulares - exceto pelas células endoteliais e epiteliais intestinais. As glândulas salivares maiores expressam, também, em suas membranas, o CD14 e secretam o CD14 solúvel (sCD14) na saliva, sendo a maior produção proveniente das glândulas parótidas. A forma solúvel também foi detectada no soro e no leite. O CD14 salivar participa da agregação do lipopolissacarídeo (LPS) e possivelmente de outros componentes bacterianos, auxilia a fagocitose e contribui, dessa forma, para a retirada de bactérias da cavidade bucal^{61,67}.

Peptídeos Catiônicos Antimicrobianos - na saliva são encontradas três famílias de peptídeos antimicrobianos: as histatinas, as defensinas e a catelicidina⁵⁰. **Histatinas**: são peptídeos ricos em histidina, arginina e lisina, têm peso molecular variado, são encontradas em abundância na saliva humana e desempenham papel de defesa contra patógenos. Pelo menos 12 peptídeos semelhantes à histatina foram identificados. Muitos desses peptídeos são fragmentos de degradação de duas histatinas, a Hist-1 e a Hist-3, que são expressas por genes próprios. São mais abundantes na saliva secretada pela parótida, mas também são produzidas pelas glândulas submandibulares. Várias atividades biológicas, in vitro, foram descritas para as histatinas, como a manutenção da integridade da superfície dos dentes, a indução de liberação de histamina, a inibição de proteases^{10,35,36,41} e a inibição do crescimento bacteriano⁴³. A Hist-5, derivada da Hist-3, causa mudança estrutural da parede celular e induz a liberação de potássio e ATP. Os resultados demonstraram que a Hist-5 é o membro mais potente no combate a espécies patogênicas de *Candida* sp., pois inibe a respiração mitocondrial e a formação de espécies reativas de oxigênio nesse gênero de fungo. Portanto, as histatinas apresentam potencial terapêutico

contra agentes causadores da candidose bucal^{35,41}. A Hist-5 não age somente sobre as mitocôndrias de *C. albicans*, mas atua também em mitocôndrias de mamíferos⁴¹. Interege com a membrana externa dessa organela, alterando a sua permeabilidade, levando à liberação de citocromo c e induzindo, dessa forma, a ativação da via de apoptose⁴¹. As **defensinas** são peptídeos, relativamente ricos em arginina, não glicosilados, com seis resíduos de cisteína, o que as torna capazes de formar três pontes dissulfeto, intramoleculares. Nos humanos, já foram identificadas seis α -defensinas e três β -defensinas. As três β -defensinas (hBD-1, hBD-2 e hBD-3) são expressas no epitélio oral, nas glândulas salivares ou nos queratinócitos bucais e têm atividade antimicrobiana de amplo-espectro - matam os microrganismos pela formação de microporos em suas membranas. A α -defensina (HNP-1), a hBD-1 e a hBD-2 são encontradas na saliva humana. As glândulas contribuem pouco para a produção de defensinas salivares, que derivam das células epiteliais, dos neutrófilos, macrófagos, monócitos e células dendríticas^{4,12,13,36,42}. A hBD-1 e a hBD-2 são ativas contra bactérias Gram-negativas e possuem atividade limitada para as bactérias Gram-positivas. A hBD-3 age contra bactérias Gram-positivas. Todas as β -defensinas atuam, ainda, sobre micobactérias, fungos e vírus envelopados, inclusive sobre o HIV^{12,14}. A HNP-1, quando encontrada em grande concentração, indica condição inflamatória na cavidade bucal^{18,31}. As defensinas aumentam o recrutamento e a atividade fagocítica de neutrófilos pela estimulação da degranulação de mastócitos e pela produção de IL-8 pelas células epiteliais⁴. As defensinas podem atuar como elo entre a imunidade inata e a adaptativa. Por exemplo, a HNP-1 e a HNP-2 são quimioatraentes para linfócitos T e as α e β -defensinas, para células dendríticas imaturas⁴. Dessa forma, as defensinas atuam lisando diretamente os microrganismos e ativando a defesa de longa duração - a imunidade adaptativa^{4,12,18,35}. **Catelicidina (hCAP18/LL-37)**: é um peptídeo antimicrobiano encontrado no epitélio bucal e na saliva, derivado dos neutrófilos e das glândulas salivares. Para o hCAP18, o precursor de LL-37, não foram descritas atividades biológicas. Porém, a ativação de hCAP18 resulta na liberação de LL-37, polipeptídeo contendo 37 aminoácidos da porção C-terminal, o qual possui amplo espectro antimicrobiano^{4,13,33,36,50}.

Estaterina: é uma pequena fosfoproteína ácida encontrada na saliva, secretada pelas glândulas sublingual e submandibular e, provavelmente, codificada por gene relacionado com as histatinas¹⁰. A função da estaterina é a inibição primária e a secundária da precipitação dos sais de fosfato de cálcio, da solução supersaturada da saliva bucal e de glândulas salivares. Dessa forma, a estaterina não age sobre as bactérias salivares e sim em bactérias ligadas à superfície de hidroxiapatita¹⁶.

VEGH, proteína da glândula de Von Ebner: é secretada pelas glândulas Von Ebner, pertence à superfamília da

lipocalina e foi descrita, originalmente, como a proteína responsável pela percepção do paladar amargo. A VEGH pode agir como inibidora de cisteína proteinase, como um produto da peroxidação do estresse-oxidativo induzido nos macrófagos e, devido à sua atividade de nuclease, pode atuar como agente antiviral, inibindo a replicação de ambos os vírus de RNA e DNA. Por estar presente na saliva, nas lágrimas e no sêmen, é provável que a função principal da VEGH seja a de agente antiviral³⁵.

SLPI: a proteína inibidora de serina proteinase foi isolada pela primeira vez de secreções respiratórias e apresenta atividade antimicrobiana e antiviral. A SLPI é secretada por várias glândulas, tais como: submandibular, sublingual, parótida e salivares menores³⁵.

TIMP-1: Inibidor tecidual de metaloproteinases. As enzimas metaloproteinases de matrix (MMP) estão envolvidas, em condições normais, na remodelagem e na reposição do tecido periodontal. A atividade das MMP é usualmente regulada por inibidores endógenos - por exemplo, os TIMP(s), que se ligam especificamente aos sítios ativos das enzimas, mantendo o equilíbrio entre a degradação e a regeneração da matrix extracelular. Os TIMP(s) são proteínas que apresentam baixos pesos moleculares, secretados por vários tipos celulares e encontrados na maioria dos fluidos e tecidos corpóreos^{19,35}. O TIMP-1 secretado na saliva pelas glândulas parótidas e submandibulares atua no controle de doenças inflamatórias³⁵. Na saliva de indivíduos com a região periodontal saudável, o TIMP-1 é encontrado em concentrações mais altas do que em pacientes com região periodontal inflamada^{19,22,35}. A bactéria *Porphyromonas gingivalis*, um dos agentes responsáveis pela periodontite crônica, degrada o TIMP-1, contribuindo para a destruição do tecido periodontal²².

Quitinase: encontrada na saliva, é derivada das glândulas parótidas, submandibulares, sublinguais e palatina. A quitina, polímero do monossacarídeo N-acetilglucosamina, está presente em plantas, leveduras e fungos. A quitinase humana salivar protege as células epiteliais da cavidade bucal contra a colonização de patógenos, que possuem quitina, principalmente leveduras e fungos, como *Candida albicans*. Na saliva de pacientes com periodontite, foram determinados níveis elevados de quitinase quando comparados com os de indivíduos saudáveis. Após o tratamento da doença periodontal, os níveis de quitinase decresceram, sugerindo que a expressão dessa proteína possa ser regulada por mediadores inflamatórios^{35,69,70}.

Calprotectina: inibe o crescimento microbiano por meio da competição pelo zinco. A calprotectina salivar é proveniente do fluido crevicular gengival e da superfície do epitélio bucal. Os níveis elevados de calprotectina sugerem a presença de foco inflamatório. A expressão de calprotectina pelas células inflamatórias (granulócitos, monócitos e macrófagos) parece proteger as células epiteliais da

ligação e da invasão por patógenos, como foi descrito para *Porphyromonas gingivalis*^{35,38}.

Cromogranina A-similes IR (CgA-similes IR): Presente na saliva evidenciando peso molecular de 47 kDa. O aumento de sua concentração está relacionado com o estresse agudo, como falar em público e dirigir um carro em via-expressa. Por isso, a CgA-similes IR parece atuar sobre o sistema simpático/adrenomedular^{24,34,35}. Apesar de não haver relatos com a CgA-similes IR, a vasostatina-1 (fragmento derivado da cromogranina A bovina) apresenta atividade antibactericida contra bactérias Gram-positivas, na concentração de micromolar, e é capaz de matar uma variedade de filamentos celulares de fungos e leveduras²⁹.

EP-GP: Glicoproteína extra-parotídea. Por apresentar afinidade pela hidroxiapatita, ajuda na formação da película dental e apresenta outras propriedades, como adesão aos microrganismos, desempenhando um papel de proteção e facilitando a eliminação das células do epitélio de mucosa³⁵.

Componente da imunidade adaptativa na saliva

As **imunoglobulinas** salivares são capazes de se ligar à maioria dos microrganismos presentes na saliva, apresentando, assim, amplo espectro de defesa, o que as difere das imunoglobulinas séricas, que possuem afinidade restrita³⁶. A IgA é considerada a classe de imunoglobulina mais importante da imunidade passiva^{11,26,32,43,53} por estar presente na saliva, nas lágrimas, no colostro, nos fluidos gastrintestinais, nas secreções bronco-nasais e na urina³², ou seja, é a imunoglobulina mais abundante no organismo, sendo encontrada em todos os tecidos mucosos. Por dia são produzidos cerca de 66 mg.kg⁻¹ de IgA³². A saliva possui, ainda, as imunoglobulinas das classes G e M²⁶.

IgA e IgM são produzidas pelas células plasmáticas que estão situadas no tecido conjuntivo subepitelial ao redor dos ductos intralobulares das glândulas salivares maiores e menores⁵⁹. São ótimas aglutinadoras e, por isso, estão presentes nos tecidos de mucosa e nas secreções. O principal componente do SIA, presente na saliva, é a imunoglobulina da classe A secretora (S-IgA), encontrada na forma dimérica¹¹. Já a IgM, primeira classe de imunoglobulina produzida na resposta imune, é secretada na forma pentamérica. Por isso, ambas as imunoglobulinas, A e M, contêm um polipeptídeo adicional, ligado às porções Fc por pontes dissulfeto, denominado de cadeia J, que serve para estabilizar os complexos multiméricos. Após secreção no fluido intersticial, as imunoglobulinas são capturadas pelas células acinares e do ducto das glândulas salivares e, subsequentemente, secretadas na saliva⁶³. As glândulas salivares menores secretam cerca de quatro vezes mais IgA do que as glândulas parótidas⁹. As células epiteliais de mucosa expressam na superfície baso-lateral **receptores poli-Ig**

que se ligam firmemente às imunoglobulinas diméricas da classe A e às pentaméricas da classe M que foram secretadas localmente. Após a ligação, a IgA e a IgM são transportadas seletivamente do lado apical do epitélio da mucosa para o lúmen do órgão pelo mecanismo de transcitose^{26,32}. A IgA é liberada pela clivagem proteolítica do **receptor poli-Ig**, que está ligado covalentemente à sua estrutura. Parte do receptor, denominado componente secretório, permanece associado com a IgA dimérica, formando a imunoglobulina da classe A secretora (S-IgA) e tornando-a resistente à proteólise³². Já a IgM não é resistente à degradação proteolítica⁴³, pois não possui esse componente secretório.

As principais funções desempenhadas pela S-IgA incluem: formação de barreira contra microrganismos, principalmente vírus, toxinas e outros antígenos; aglutinação de microrganismo; bloqueio das adesinas bacterianas que se ligam ao receptor da célula epitelial; ação sinérgica pela junção com os outros componentes antimicrobianos do SII; neutralização de vírus dentro de células epiteliais através da transcitose; excreção de antígenos da camada subepitelial, também pelo mecanismo de transcitose, nas secreções; promoção da fagocitose e da citotoxicidade celular dependente de anticorpo; e ativação da Via Alternativa do Sistema Complemento. Em contraste com a IgA sérica, a S-IgA não desempenha função de opsonina. A S-IgA é capaz de inibir a “cascata” da Via Clássica do Sistema Complemento, mesmo após ter sido ativada pela IgG. Recentemente foi demonstrado que a S-IgA pode ser secretada pelos linfócitos B1 e B. Os linfócitos B1 são encontrados na cavidade peritoneal e participam da resposta Imune Inata, pois são T-independentes. Já os linfócitos B dependem das citocinas liberadas pelos linfócitos T auxiliares e, portanto, estão envolvidos na Resposta Imune Adaptativa. Os B1 são responsáveis pela secreção de 25% das S-IgA, que reconhecem bactérias comensais, enquanto os linfócitos B encontrados nos centros germinativos dos tecidos linfóides associados à mucosa (MALT) secretam 75% de S-IgA envolvidas no reconhecimento de exotoxinas⁴⁰. A Imunoglobulina da Classe A tem duas subclasses: IgA1 e IgA2. A distribuição dessas subclasses varia nos diferentes sítios de mucosa. A IgA2 predomina (60%) no trato gastrointestinal; a IgA1, nas glândulas salivares (60-80%) e nos **tecidos linfóides associados às glândulas salivares e nasais** - NALT (90%)¹⁷. As duas subclasses diferem pela ausência, na molécula da IgA2, da seqüência de 13 aminoácidos na região da dobradiça. Essa diferença pode explicar a resistência da IgA2 contra a ação de proteases bacterianas tais como: *Streptococcus mutans*, *Neisseria meningitidis* e *Haemophilus influenzae*³². A IgA tem a capacidade de inibir várias enzimas e retardar a colonização bacteriana, mesmo nos primeiros estágios, nas superfícies dentais da cavidade bucal⁷⁴. Em pacientes com cáries inativas, foram observadas concentrações de IgA salivar significativamente

mais altas do que nos pacientes com lesões de cáries ativas⁹. A produção de S-IgA pode estar relacionada com o tipo de HLA de classe II. Por exemplo: indivíduos que expressam HLA-DR4 apresentam IgA salivar de baixa afinidade para o *Streptococcus mutans*. A possível explicação para esse fato seria que os alelos do HLA-DR4 possuem, em sua fenda, aminoácidos que se ligam fracamente aos peptídeos antigênicos dos *S. mutans*, induzindo uma resposta imunológica ineficaz⁷². Baixos títulos de S-IgA e IgM salivares são associados com o aumento de risco de infecções nos tratos respiratórios superiores. Estudos mostram que o efeito de exercícios físicos está associado com o aumento de risco de doenças respiratórias devido à redução dos níveis de IgA1, mas não de IgA2 nas secreções de mucosa¹⁷. A quantidade de S-IgA secretada varia de acordo com o desenvolvimento ontogenético do indivíduo. Por exemplo, ao nascimento, os níveis de S-IgA são indetectáveis, porém há um aumento contínuo até os 7 anos de idade, permanecendo constante da puberdade à idade adulta e decaindo na senilidade. Durante o estágio de deficiência de S-IgA, a IgM desempenha papel importante na proteção da cavidade bucal, principalmente de neonatos¹⁷. Não há relatos de diferenças de níveis de S-IgA entre os gêneros²⁸.

A IgG na saliva pode ser produzida localmente por uma minoria de plasmócitos provenientes do soro, ou, ainda, chegar à cavidade bucal pelo fluido crevicular por meio do sulco gengival, ou ser derivada do soro por difusão quando ocorre inflamação local ou lesão do tecido epitelial^{17,26,43}. As imunoglobulinas da classe G são importantes na proteção dos tratos respiratório e genital feminino¹⁷. Porém, não existe mecanismo de transporte, nas células epiteliais de mucosa, para que as IgG alcancem a cavidade bucal. Na saliva de indivíduos saudáveis, observa-se, por análise pelo método Dot-ELISA, que a IgA apresenta-se em maiores títulos, seguida pelas IgG e IgM (manuscrito em preparação).

Micelas: são formadas por componentes pertencentes aos dois sistemas imunes, o Inato e o Adaptativo, os quais, juntos, desempenham funções importantes na manutenção da homeostasia da cavidade bucal⁴⁹. São descritas como estruturas globulares, com dimensão entre 100 a 500 nm, que aglutinam bactérias e participam na formação da película de esmalte. As micelas são compostas por proteínas salivares que interagem por meio de forças moleculares, como: íon-dipolo, íon-íon, ponte de hidrogênio, forças hidrofóbicas e forças de van der Waals, resultando em novas estruturas protéicas com atividades biológicas. As interações entre proteínas podem produzir complexos homotípicos e heterotípicos. As micelas salivares são exemplos de grandes complexos heterotípicos, pois são formadas por multicomponentes tais como: mucinas, aglutinina, S-IgA, lactoferrina, lactoperoxidase, amilase, proteínas ricas em prolina, estaterina e histatinas. As interações protéicas parecem ser cálcio-dependentes. A MUC5B, a mucina de alto peso molecular, forma micelas

seletivamente com as proteínas amilase, ricas em prolina, estaterinas e histatinas. Porém, não interage com a MUC7, a mucina de baixo peso molecular, e com a S-IgA. O complexo formado por MUC7 e S-IgA na saliva aumenta o “clearance” microbiano, protegendo a cavidade bucal da colonização por agentes patogênicos. Normalmente, a aglutinina e a S-IgA podem ser encontradas associadas na saliva e essa mistura induz a agregação bacteriana. O efeito antimicrobiano do sistema lactoperoxidase sobre *Streptococcus mutans* foi aumentado com a associação da S-IgA⁷².

Conclusão

Como mencionado anteriormente nesta revisão, o SIA surge nos animais providos de mandíbulas, e isso confirma a importância da cavidade bucal para a entrada de agentes patogênicos no organismo. Apesar da importância dessa cavidade, poucos trabalhos foram encontrados na literatura científica sobre imunidade de mucosa bucal, como também sobre componentes celulares presentes na saliva. Portanto, torna-se imprescindível o desenvolvimento de trabalhos que elucidem as funções imunológicas desempenhadas pelas moléculas e células salivares, pois muito contribuirão para o conhecimento e o diagnóstico de patologias bucais e sistêmicas.

Agradecimentos

Agradecemos ao Mestre Fabrício Kitazono de Carvalho pela revisão e pelas sugestões do texto; à Jornalista Denise do Carmo Mirás pela revisão ortográfica; ao MSc Eduardo Akifumi Ono pela revisão do texto em inglês e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) pelo fomento aos trabalhos realizados em nosso laboratório.

Referências

1. Almståhl A, Wikström M, Groenink J. Lactoferrin, amylase and mucin MUC5B and their relation to the oral microflora in hyposalivation of different origins. *Oral Microbiol Immunol*. 2001;16:345-52.
2. Almståhl A, Wikström M. Electrolytes in stimulated whole saliva in individuals with hyposalivation of different origins. *Arch Oral Biol*. 2003;48:337-44.
3. Aps JKM, Van den Maagdenberg K, Delanghe JR, Martens LC. Flow cytometry as a new method to quantify the cellular content of human saliva and its relation to gingivitis. *Clin Chim Acta*. 2002;321:35-41.
4. Basset C, Holton J, O'Mahony R, Roitt I. Innate immunity and pathogen-host interactions. *Vaccine*. 2003;21(Suppl 2):12-23.
5. Born WK, Reardon CL, O'Brien R L. The function of $\gamma\delta$ T cells in innate immunity. *Curr Opin Immunol*. 2006;18:31-8.
6. Beutler B, Jiang Z, Georgel P, Crozat K, Croker B, Rutschmann S, et al. Genetic analysis of host resistance: toll-like receptor signaling and immunity at large. *Annu Rev Immunol*. 2006;24:353-89.
7. Biesbrock AR, Bobek LA, Levine MJ. MUC7 gene expression and genetic polymorphism. *Glycoconj J*. 1997;14:415-22.
8. Boches SK, Paster BJ, Dewhirst, FE. Development of a human oral microbe identification microarray [abstract 2263]. *J Dent Res*. 2004;83(Special Issue) [cited 2006 Oct 10]. Available from: <http://www.dentalresearch.org>
9. Brown LR, Dreizen S, Daly TE, Drane JB, Handler S, Riggan LJ, et al. Interrelations of oral microorganisms, immunoglobulins, and dental caries following radiotherapy. *J Dent Res*. 1978;57:882-93.
10. Castagnola M, Congiu D, Denotti G, Di Nunzio A, Fadda MB, Melis S, et al. Determination of the human salivary peptides histatins 1, 3, 5 and statherin by high-performance liquid chromatography and by diode-array detection. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*. 2001;751:153-60.
11. Childers NK, Greenleaf C, Li F, Dasanayake AP, Powell WD, Michalek SM. Effects of age on immunoglobulin A subclass distribution in human parotid saliva. *Oral Microbiol Immunol*. 2003;18:298-301.
12. Dale ba, Krisanaprakornkit s. Defensin antimicrobial peptides in the oral cavity. *J Oral Pathol Med*. 2001;30:321-7.
13. Devine DA. Antimicrobial peptides in defence of the oral and respiratory tracts. *Mol Immunol*. 2003;40:431-43.
14. Dunsche A, Açil Y, Dommisch H, Siebert R, Schröder JM, Jepsen S. The novel human beta-defensin-3 is widely expressed in oral tissues. *Eur J Oral Sci*. 2002;109:121-4.
15. Farnaud S, Evans RW. Lactoferrin – a multifunctional protein with antimicrobial properties. *Mol Immunol*. 2003;40:395-405.
16. Gilbert M, Stayton PS. Expression and characterization of human salivary statherin from *Escherichia coli* using two different fusion constructs. *Protein Expr Purif*. 1999;16:243-50.
17. Gleeson M, Pyne DB. Special feature for the Olympics: effects of exercise on the immune system: exercise effects on mucosal immunity. *Immunol Cell Biol*. 2000;78:536-44.
18. Goebel C, Mackay LG, Vickers ER, Mather LE. Determination of defensin HNP-1, HNP-2, and HNP-3 in human saliva by using LC/MS. *Peptides*. 2000; 21:757-65.
19. Grenier D, Mayrand D. Inactivation of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) by *Porphyromonas gingivalis*. *FEMS Microbiol Lett*. 2001;203:161-4.
20. Groenink J, Walgreen-Weterings E, Van't Hof W, Veerman EC, Nieuw Amerongen AV. Cationic amphipatic

- peptides, derived from bovine and human lactoferrins, with antimicrobial activity against oral pathogens. *FEMS Microbiol Lett.* 1999;179:217-22.
21. Gururaja TL, Levine JH, Tran DT, Naganagowda GA, Ramalingam K, Ramasubbu N, et al. Candidacidal activity prompted by N-terminus histatin-like domain of human salivary mucin (MUC7). *Biochim Biophys Acta.* 1999;1431: 107-19.
 22. Hayakawa H, Yamashita K, Ohwaki K, Sawa M, Noguchi T, Iwata K, et al. Collagenase activity and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) content in human whole saliva from clinically healthy and periodontally diseased subjects. *J Periodontal Res.* 1994;29:305-8.
 23. Holand MCH, Lambris JD. The complement system in teleosts. *Fish & Shellfish Immunology.* 2002;12:399-420.
 24. Huang C-M. Comparative proteomic analysis of human whole saliva. *Arch Oral Biol.* 2004;49:951-62.
 25. Janeway CA, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol.* 2002;20:197-216.
 26. Lamm ME. Interactions of antigens and antibodies at mucosal surfaces. *Annu Rev Microbiol.* 1997;51:311-40.
 27. Litman GW, Anderson MK, Rast JP. Evolution of antigen binding receptors. *Annu Rev Immunol.* 1999;17:109-47.
 28. Liu C-M, Tung K-H, Chang T-H, Chien C-C, Yen M-H. Analysis of secretory immunoglobulin A in human saliva by laser-induced fluorescence capillary electrophoresis. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2003;791:315-21.
 29. Lugardon K, Raffiner R, Goumon Y, Corti A, Delmas A, Bulet P, et al. Antibacterial and antifungal activities of vasostatin-1, the N-terminal fragment of chromogranin A. *J Biol Chem.* 2000;275:10745-53.
 30. Mandel ID. The role of saliva in maintaining oral homeostasis. *J Am Dent Assoc.* 1989;119:298-304.
 31. Mizukawa N, Sugiyama K, Ueno T, Mishima K, Takagi S, Sugahara T. Levels of human defensin-1, an antimicrobial peptide, in saliva of patients with oral inflammation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1999; 87:539-43.
 32. Monteiro RC, van de Winkel JG. IgA Fc receptors. *Annu Rev Immunol.* 2003;21:177-204.
 33. Murakami M, Ohtake T, Dorschner RA, Gallo RL. Cathelicidin antimicrobial peptides are expressed in salivary glands and saliva. *J Dent Res.* 2002;81:845-50.
 34. Nakane H, Asami O, Yamada Y, Ohira H. Effect of negative air ions on computer operation, anxiety and salivary chromogranin A-like immunoreactivity. *Int J Psychophysiol.* 2002;46:85-9.
 35. Nieuw Amerongen AV, Veerman ECI. Salivary glands and saliva – number 2. Saliva – the defender of the oral cavity. *Oral Diseases.* 2002;8:12-22.
 36. Nieuw Amerongen AV, Bolscher JGM, Veerman ECI. Salivary proteins: protective and diagnostic value in cariology? *Caries Res.* 2004;38:247-53.
 37. Nikawa H, Samaranayake LP, Tenovou J, Pang KM, Hamada T. The fungicidal effect of human lactoferrin on *Candida albicans* and *Candida krusei*. *Arch Oral Biol.* 1993;38:1057-63.
 38. Ozmeric N. Review: advances in periodontal disease markers. *Clin Chim Acta.* 2004;343:1-16.
 39. Pasare C, Medzhitov R. Toll-like receptors: linking innate and adaptive immunity. *Microbes Infect.* 2004;6:1382-7.
 40. Pedersen AM, Bardow A, Beier Jensen S, Nauntofte B. Salivary glands and saliva – number 5. Saliva and gastrointestinal functions of taste, mastication, swallowing and digestion. *Oral Dis.* 2002;8:117-29.
 41. Petruzzelli R, Clementi ME, Marini S, Coletta M, DiStasio E, Giardina B, et al. Respiratory inhibition of isolated mammalian mitochondria by salivary antifungal peptide histatin-5. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;311:1034-40.
 42. Raj PA, Dentino AR. Current status of defensins and their role in innate and adaptive immunity. *FEMS Microbiol Lett.* 2002;206:9-18.
 43. Rantonen P. Salivary flow and composition in healthy and diseased adults [Academic Dissertation]. Finland: Faculty of Medicine, University of Helsinki; 2003.
 44. Sakamoto M, Umeda M, Benno Y. Molecular analysis of human oral microbiota. *J Periodontal Res.* 2005;40:277-85.
 45. Samaranayake YH, Samaranayake LP, Pow EHN, Beena VT, Yeung KWS. Antifungal effects of lysozyme and lactoferrin against genetically similar, sequential *Candida albicans* isolates from a human immunodeficiency virus-infected southern Chinese cohort. *J Clin Microbiol.* 2001;39:3296–302.
 46. Samuelsen Ø, Haukland HH, Ulvatne H, Vorland LH. Anti-complement effects of lactoferrin-derived peptides. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2004;41:141-8.
 47. Shin ES, Chung SC, Kim YK, Lee SW, Kho HS. The relationship between oral *Candida* carriage and the secretor status of blood group antigens in saliva. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2003;96:48-53.
 48. Slomiany BL, Murty VLN, Piotrowski J, Slomiany A. Salivary mucins in oral mucosal defense. *Gen Pharmac.* 1996;27:761-71.
 49. Soares RV, Lin T, Siqueira CC, Bruno LS, Li X, Oppenheim FG, et al. Salivary micelles: identification of complexes containing MG2, sIgA, lactoferrin, amylase, glycosylated proline-rich protein and lysozyme. *Arch Oral Biol.* 2004;49:337-43.
 50. Sörensen OE, Follin P, Johnsen AH, Calafat J, Tjabringa GS, Hiemstra PS, et al. Human cathelicidin,

- hCAP18, is processed to the antimicrobial peptide LL37 by extracellular cleavage with proteinase 3. *Blood*. 2001;97:3951-9.
51. Soukka T, Tenovou J, Lenander-Lumikari m. Fungicidal effect of human lactoferrin against *Candida albicans*. *FEMS Microbiol Lett*. 1992;69:223-8.
 52. Souza GFM, Andrade ESS, Miranda JL, Alves RD, Pinto LP, Almeida D. Abordagem imunológica da cárie dental. *PGR: Pós-Graduação em Revista*. 2001;4(2):28-33.
 53. Souza RM, Lehn CN, Denardin OVP. Níveis sérico e salivar de imunoglobulina A em portadores de câncer da boca e orofaringe. *Rev Assoc Med Bras*. 2003;49:40-4.
 54. Sreebny LM, Banoczy J, Baum BJ, Edgar WM, Epstein JB, Fox PC. Saliva: Its role in health and disease. *Int Dent J*. 1992;42(4 Suppl 2):287-304.
 55. Streckfus CF, Bigler LR. Salivary glands and saliva number 3- Saliva as a diagnostic fluid. *Oral Dis*. 2002;8:69-76.
 56. Tabak LA, Levine MJ, Mandel ID, Ellison SA. Role of salivary mucins in the protection of the oral cavity. *J Oral Pathol*. 1982;11:1-7.
 57. Tabak LA. In defense of the oral cavity: structure, biosynthesis and function of salivary mucins. *Ann Rev Physiol*. 1995; 57: 547-64.
 58. Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol*. 2003;21:335-76.
 59. Takei T, Aono W, Nagashima S, Yoshida T, Hashida T, Sobue S, et al. Change of salivary IgA secretion and caries development in irradiated rats. *J Dent Res*. 1994;73:1503-8.
 60. Takubo T, Yamane T, Tsuda I, Tagawa S, Tatsumi N. Polymorphonuclear neutrophils in saliva and blood: a comparative study of morphology, function and phenotype. *Br J Biomed Sci*. 1997;54:260-6.
 61. Takayama A, Satoh A, Ngai T, Nishimura T, Ikawa K, Matsuyama T, et al. Augmentation of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* invasion of human oral epithelial cells and up-regulation of interleukin-8 production by saliva CD14. *Infect Immun*. 2003;71:5598-604.
 62. Takahama U, Hirota S, Nishioka T, Oniki T. Humana salivary peroxidase-catalyzed oxidation of nitrite and nitration of salivary components 4-hydroxyphenylacetic acid and proteins. *Arch Oral Biol*. 2003;48:679-90.
 63. Ten Cate R. *Histologia bucal. Desenvolvimento, estrutura e função*. 5ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 2001.
 64. Tenovou JO. *Human saliva: clinical chemistry and microbiology*. Florida: CRC Press; 1989.
 65. Tenovou JO, Lagerlöf F. Saliva. In: Thylstrup, A.; Fejerskov, O. *Cariologia clínica*. São Paulo: Livraria Editora Santos; 1995. p.17-43.
 66. Tenovou JO. Clinical applications of antimicrobial host proteins lactoperoxidase, lysozyme and lactoferrin in xerostomia: efficacy and safety. *Oral Dis*. 2002;8:23-9.
 67. Uehara A, Sugawara S, Watanabe K, Echigo S, Sato M, Yamaguchi T, et al. Constitutive expression of a bacterial pattern recognition receptor, CD14, in human salivary glands and secretion as a soluble form in saliva. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2003;10:286-92.
 68. Ueta E, Osaki T, Yoneda K, Yamamoto T. Functions of salivary polymorphonuclear leukocytes (SPMNs) and peripheral blood polymorphonuclear leukocytes (PPMNs) from healthy individuals and oral cancer patients. *Clin Immunol Immunopathol*. 1993;66:272-8.
 69. Van Steijn GJ, Nieuw Amerongen AV, Veerman EC, Kananmoentalib S, Overdijk B. Chitinase in whole human saliva and glandular human salivas and in whole saliva of patients with periodontal inflammation. *Eur J Oral Sci*. 1999; 107:328-37.
 70. Van Steijn GJ, Nieuw Amerongen AV, Veerman EC, Kananmoentalib S, Overdijk B. Effect of periodontal treatment on the activity of chitinase in whole saliva of periodontitis patients. *J Periodontal Res*. 2002;37:245-9.
 71. Veerman ECI, van der Keijbus PAM, Nazmi K, Vos W, van der Wal JE, Bloemena E, et al. Distinct localization of MUC5B glycoforms in the human salivary glands. *Glycobiology*. 2003;13:363-6.
 72. Wallengren MLL, Hamberg K, Ericson D, Nordberg J. Low salivary IgA activity to cell-surface antigens of mutans streptococci related to HLA-DRB1*04. *Oral Microbiol Immunol*. 2005;20:73-81.
 73. Zasloff M. Innate immunity, antimicrobial peptides, and protection of the oral cavity. *The Lancet*. 2002;360:1116-7.
 74. Zee KY, Samaranyake LP, Attstrom R. Salivary immunoglobulin A levels a rapid and slow plaque formers: a pilot study. In: Rantonen P. *Salivary flow and composition in healthy and diseased adults* [Academic Dissertation]. Finland: Faculty of Medicine, University of Helsinki; 2003.

