EDUARDO KAZUO KOHARA

**Estudo proteômico da saliva de adolescentes acometidos de lesões de cárie
ativas em diferentes estágios de severidade**

São Paulo

2016

EDUARDO KAZUO KOHARA

**Estudo proteômico da saliva de adolescentes acometidos de lesões de cárie
ativas em diferentes estágios de severidade**

Versão Original

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia
da Universidade de São Paulo, para obter o
título de Doutor, pelo Programa de Pós-
Graduação em Ciências Odontológicas.

Área de Concentração: Odontopediatria

Orientador: Prof. Dr. Fausto Medeiros Mendes

Coorientador: Prof. Dr. Walter Luiz Siqueira Jr.

São Paulo

2016

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo da Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Kohara, Eduardo Kazuo.

Estudo proteômico da saliva de adolescentes acometidos de lesões de cárie ativas em diferentes estágios de severidade / Eduardo Kazuo Kohara; orientador Fausto Medeiros Mendes -- São Paulo, 2016.

88 p : fig., tab.; 30 cm.

Tese (Doutorado) -- Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas. Área de Concentração: Odontopediatria. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão original.

1. Saliva. 2. Proteínas. 3. Cárie dentária. 4. Eletroforese. 5. Espectometria. I. Mendes, Fausto Medeiros. II. Título.

Kohara EK. Estudo proteômico da saliva de adolescentes acometidos de lesões de cárie ativas em diferentes estágios de severidade. Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências Odontológicas.

Aprovado em: / /2016

Banca Examinadora

Prof(a).Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a).Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a).Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a).Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a).Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

À minha FAMÍLIA: meus PAIS, que sempre me apoiaram em todos os momentos da minha vida e por quererem sempre o melhor para os filhos, e aos meus IRMÃOS, pela presença e pelo companheirismo. E aos TIOS e PRIMOS, pelo carinho, por estarem sempre presentes, cuidando e apoiando uns aos outros.

Aos meus AVÓS, onde quer que estejam, por sempre batalharem em oferecerem o melhor aos filhos, e que sejam também recompensados pelas conquistas dos netos. Em especial meu avô materno, Taishi Nakamura, que desde sempre foi minha inspiração a entender o mundo que nos cerca.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Fausto Medeiros Mendes, não só por aceitar o desafio de orientar no desenvolvimento deste trabalho, mas também por buscar incansavelmente e conquistar a excelência em nível mundial no Brasil. Sempre de bom humor e palavras suaves, certamente é uma inspiração a todos no seu trato com seus alunos, pacientes e colegas de trabalho, no carinho, nas palavras de incentivo e também nas broncas quando são necessárias. E também à sua família, Maria e JP, por compreender os momentos em que o marido e pai precisa estar ausente por motivos de trabalho.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Walter Luiz Siqueira, por não só abrir as portas do seu laboratório na UWO, colocar toda a sua estrutura à minha disposição e poder me proporcionar uma maravilhosa experiência no Canadá, mas também por mostrar para todo o mundo o nível de trabalho que um brasileiro pode alcançar no exterior com determinação e envolvimento inigualáveis. Sempre com pensamento rápido e ideias inesgotáveis, sem o seu apoio este trabalho não teria sido possível. E também à sua família, Michele e filhos o meu muito obrigado.

Aos meus amigos Luis Suzuki (China), Renato Prates e Ilka Kato, pela ajuda e incentivo para iniciar este curso de Doutorado.

Aos Profs. Drs. Ana Lúcia Ciamponi, da Odontopediatria da FOU SP, e Silvio Issao Myaki, da UNESP-SJC, pelas críticas e sugestões dadas ao projeto por ocasião do Exame de Qualificação.

Aos Professores da Disciplina de Odontopediatria da FOU SP: Mariana Minatel Braga, Daniela Raggio, Ana Estela Haddad, Marcia Wanderley, Marcelo Bonecker, Maria Salete Nahas Correa e José Carlos Imparato pelos ensinamentos, pelo apoio e pelas palavras sempre amigas na nossa convivência pelos corredores da faculdade, nas clínicas de atendimento e nas aulas e fora delas.

Ao colega de curso Levy Anderson Alves, por sempre apoiar, ensinar e discutir nos estudos trabalhos sobre ômicas e o desenvolvimento da pesquisa. Sempre sugerindo cursos e disciplinas, muito do que pude aprender de Bioquímica neste curso

só foi possível graças às suas contribuições. Muito obrigado e sei que terá muito sucesso no futuro.

Às colegas de turma Camilla Abdala e Evelyn Vidigal. Quantos momentos passamos juntos nas aulas dos créditos, e também assistindo às aulas teóricas, práticas e clínicas, dentro e fora da faculdade. Vários momentos divertidos e de muito aprendizado.

Às colegas Carol Moriyama e Fernanda Rosche por apoiar e responder muitas das minhas dúvidas a respeito de detecção de lesões de cáries nos adolescentes e também pela possibilidade de acompanhar os atendimentos de suas pesquisas, que muito ajudou no desenvolvimento deste estudo.

Às demais orientadas do Prof. Fausto: Tati Novaes, Thais Gimenez, Renata Saraiva, Carmela Bresolin, Laura Pontes e Bruna Moro pelos bons momentos que passamos, pelas discussões de trabalhos, nos atendimentos do CARDEC. Não esquecendo dos colaboradores desse estudo: Haline, Lucas, Renata Marques e muitos outros que não citei aqui, obrigado a todos!

Aos colegas de departamento que já passaram e aos que ainda estão na busca de seus objetivos, pelos momentos de convivência em todas as atividades da disciplina, no departamento, na faculdade e fora dela: Ju Kimura, Gustavo Tello, Ale Reyes, Taci Couto, Deise Garrido, Dani Hesse, Isabel Cristina, Laysa, Tamara, Ana Flávia, Pat Carvalho, Juan Lara, Muri Pedrosa, Juliana Mattos, Isa Floriano, Tuca Matos, Lu Pion, Rafael, Helena, Caleb, Karla, Gabi Berti, Thais C., Nathalia, Ivonne, Aline, Elizabeth, Rodrigo, Javier e Mariana.

Aos funcionários da secretaria da Odontopediatria: Marize, Fátima, Júlio, Antonio, Anne; da Ortodontia: Edina e Vivi, e da limpeza, em especial Eva e Kay. Muito obrigado por serem tão prestativos, sempre me ajudaram com sorriso no rosto e muita boa vontade, mesmo quando ouviram de mim que precisava das ajudas mais que urgentes.

A todos os professores das disciplinas que cursei, pelos esclarecimentos e ideias que foram de extrema importância não só para este projeto de pesquisa, mas também fora dela.

À Secretaria de Pós-Graduação, em especial às funcionárias Cátia e Alessandra, por sempre serem solícitas esclarecendo todas as dúvidas nos

procedimentos, em especial no preparativo dos documentos para submeter ao estágio-sanduíche.

Ao Prof. Fernando Nogueira e ao técnico Douglas N. Souza, do Laboratório de Biologia Oral da FOUSP, pelos esclarecimentos das minhas dúvidas quanto ao manuseio de material.

Aos amigos David Zuanazzi e Karla Crosara, com quem pude ter momentos de convivência e aprendizado no Canadá, dentro da UWO, por me ensinarem e ajudarem em muitos, se não em todos os experimentos e análises que lá realizei, e fora da UWO por me proporcionarem momentos inigualáveis de convivência no Canadá. A vocês e a suas famílias, felicidades.

To Heidi and all Liao Family (Clayton, Tom, Mary, Shirley, Franco e Tony), for sheltering myself, being my Family in Canada and giving me the opportunity of learning so much about Canadian and Chinese cultures. Great Canadian time I will never forget.

To Yizhi Xiao (Cindy), thanks for all your efforts to get and analyze mass spec data. And of course, for all your kindness for always answering my questions about Chemistry, lab stuffs and Canada in general. And not forgetting your bike, which was so helpful in summertime.

To all people from Siqueira Lab in UWO: Samia, Raj, Mariana, Vinicius and Paula. And also for Mel, which was not officially a Siqueira Lab member, but was often by our side, specially in lunch time.

A Eduardo Moffa, Carolina Mussi e Marcia Tanaka, com quem não pude ter convivência na UWO, mas foram fundamentais ao gentilmente responderem aos meus questionamentos antes e durante a minha estadia no Canadá.

Aos participantes deste estudo, pois sem a sua colaboração isto não seria possível.

À CAPES, pelo suporte financeiro por todo o meu curso, no Brasil e no Canadá.

Aos meus amigos o meu muito obrigado. Não colocarei os seus nomes um a um para não cometer a indelicadeza de esquecer o nome de alguém, o que certamente faria aqui.

E a todos os que direta ou indiretamente me apoiaram até aqui.

RESUMO

Kohara EK. Estudo proteômico da saliva de adolescentes acometidos de lesões de cárie ativas em diferentes estágios de severidade [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2016. Versão Original.

O presente estudo teve por objetivo comparar a composição da saliva de adolescentes com lesões de cárie ativas com a de jovens livres de lesões de cárie. Doze adolescentes com idade média de 15,2 (desvio padrão = 1,6) anos foram divididos em três grupos de acordo com acometimento pela cárie dentária: Grupo CA – participantes com o mínimo de quatro lesões cariosas cavitadas ativas (n=4), classificadas com os escores 5 e/ou 6 pelo Sistema Internacional de Detecção e Avaliação de Cárie (ICDAS, do inglês International Caries Detection and Assessment System); Grupo MB – adolescentes (n = 4) com pelo menos quatro lesões cariosas iniciais ativas (ICDAS 1 e/ou 2); e grupo CO – composto de participantes sem lesões de cárie ativas (n = 4). Proteínas provenientes de saliva estimulada (20 µg) foram submetidas a espectrometria de massa e eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) em três experimentos independentes. Valores densitométricos de quinze bandas de diferentes pesos moleculares dos géis SDS-PAGE foram mensurados e analisados por análise de variância ($p < 0,05$). Espectrometria de massa foi realizada para identificar e caracterizar o proteoma das bandas que mostraram diferenças em três diferentes géis. A quantificação relativa consistiu na realização de eletroforese SDS-PAGE contendo proteínas salivares dos grupos MB e CO pareadas lado a lado de acordo com a concentração de proteínas total. As bandas foram analisadas densitometricamente e as proteínas nelas contidas foram também quantificadas por espectrometria de massa. Resultados encontrados na análise com SDS-PAGE revelaram que quatro bandas de alto e baixo peso molecular do grupo MB se mostraram estatisticamente quando comparadas ao grupo CO. As amostras do grupo CA não mostraram diferenças na comparação ao grupo CO. A análise por espectrometria de massa revelou o conteúdo proteico das amostras de saliva e das bandas eletroforéticas dos géis SDS-PAGE que demonstraram diferenças. A análise quantitativa relativa mostrou as diferenças entre os grupos nas bandas de alto, médio e baixo pesos moleculares, bem como das proteínas nelas

presentes. Este estudo concluiu que existem diferenças na composição proteômica da saliva de adolescentes acometidos por cárie quando comparados a jovens sem lesões ativas, principalmente quando se considerou lesões de cárie iniciais.

Palavras-chave: Saliva. Proteínas. Cárie dentária. Eletroforese. Espectrometria de massa.

ABSTRACT

Kohara EK. Salivary proteome of adolescents with active caries lesions with different severity stages [thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2016. Versão Original.

This study aimed to compare the salivary protein content of adolescents presenting active caries lesions with caries-free persons. Twelve adolescents with average age of 15.2 (standard deviation=1.6) years old were divided into three groups according to the caries occurrence: Group CA – participants with at least four active cavitated caries lesions (n = 4), classified as scores 5 and/or 6 according to the International Caries Detection and Assessment System (ICDAS); Group MB – adolescents (n = 4) in which subjects showed at least four cavitated active lesions (ICDAS 5 and 6), group MB (n=4) with at least four active initial caries lesions (scores 1 and/or 2 of ICDAS); and group CO – with subjects with no active caries lesions (n = 4). Proteins from stimulated saliva (20 µg) were submitted to sodium-dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) in three independent experiments. Densitometric values from fifteen bands of different molecular weights were measured and analyzed with analysis of variance ($p<0.05$). Mass spectrometry was used to identify and characterize the proteome from electrophoretic bands. Relative quantification consisted in submit to SDS-PAGE salivary protein samples paired by total protein concentration from groups MB and CO. Electrophoretic bands were densitometrically analyzed, and their protein content were quantified with mass spectrometry. Results from SDS-PAGE revealed that four bands of high and low molecular weight from group MB were statistically higher when compared to group CO. Samples from group CA did not show differences when compared to group CO. Mass spectrometry showed the protein content from SDS-PAGE electrophoretic bands. Relative quantitative analysis showed differences among groups in bands of high, middle and low molecular weights, as well in their proteins. This study concludes that there are differences in the proteomic composition of saliva from adolescents with active caries lesions when compared to persons with no active caries lesions, mainly considering initial active caries lesions.

Keywords: Saliva. Proteins. Dental caries. Electrophoresis. Mass spectrometry.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	16
3	PROPOSIÇÃO	30
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	31
5	RESULTADOS.....	44
6	DISCUSSÃO	64
7	CONCLUSÕES	73
	REFERÊNCIAS.....	74
	ANEXOS	84
	APÊNDICES	87

1 INTRODUÇÃO

O progresso de boa parte das doenças orais está relacionado à interação dos tecidos que compõem a cavidade oral e as bactérias que nela habitam. Particularmente no caso das lesões de cárie, essas são consequência das trocas iônicas entre a porção mineral do dente e à fase líquida ao redor dos dentes, em especial, a saliva e o fluido do biofilme bacteriano e dos espaços intercristalinos. As bactérias relacionadas à formação de lesões de cárie, que são habitantes naturais da cavidade bucal, consomem os açúcares fermentáveis provenientes da alimentação do hospedeiro humano, produzindo ácidos que diminuem temporariamente o pH do meio ao redor dos dentes. Esse pH reduzido promove a desmineralização, processo no qual ocorre a dissolução da hidroxiapatita dos tecidos dentários mineralizados e a consequente perda de minerais para os fluidos orais. Esse pH retorna na sequência à neutralidade, quando ocorre um ganho mineral por parte do dente, processo esse conhecido como remineralização. Caso haja um desequilíbrio dessas trocas iônicas com a ocorrência de episódios seguidos de desmineralização, com o tempo decorrido e a repetição desses episódios, lesões de cárie podem aparecer, cujas fases iniciais são passíveis de recuperação sem grandes perdas estruturais do dente, mas que nas fases mais avançadas, esses danos são irreversíveis (Cury; Tenuta, 2009).

Componentes salivares, particularmente proteínas como a estaterina, podem intermediar esse processo de perda e ganho dos íons cálcio e fosfato pelo dente (Vukosavljevic *et al.*, 2014). Da mesma forma, outras proteínas possuem a capacidade de interferir com o processo de formação das lesões cariosas de outras formas, interferindo na adesão das bactérias sobre a superfície dental ou combatendo-as diretamente por meio da defesa inata adquirida (Amerongen; Veerman, 2002). Alguns estudos relacionam alterações no conteúdo proteico salivar com a formação de lesões de cárie, porém esses estudos utilizaram saliva de sujeitos acometidos de lesões cavitadas (Banderas-Tarabay *et al.*, 2002; Vitorino *et al.*, 2006; Roa *et al.*, 2008), ou seja, lesões em um estágio de desenvolvimento da doença cujas consequências são irreversíveis. Nenhum estudo foi encontrado relacionando o conteúdo proteico da saliva de sujeitos com lesões de cárie iniciais, fases nas quais poderia se tomar maior proveito do conhecimento para o futuro desenvolvimento de produtos e protocolos que

possam prevenir o desenvolvimento dessa doença e reverter o processo após iniciado.

Nos últimos anos, houve um grande desenvolvimento nas técnicas bioquímicas de caracterização e identificação de proteínas. Métodos contemporâneos como a espectrometria de massa foram desenvolvidos e são utilizados associados aos métodos de caracterização de proteínas já tradicionais como a eletroforese (Beranova-Giorgianni, 2003). Essa abordagem possui vantagens tais como o aumento da sensibilidade e da especificidade do método espectrométrico por possibilitar estudos utilizando diferentes características da molécula como peso molecular, cargas moleculares e outros fatores que modificam a motilidade eletroforética. Um estudo prévio utilizou essa abordagem para o estudo da saliva de pacientes acometidos com cárie e encontrou diferenças nos níveis de diferentes proteínas quando comparados a pacientes saudáveis, porém essa amostra foi constituída de sujeitos que possuíam lesões em fases avançadas (Vitorino et al., 2006).

Diante do exposto, o presente estudo se propõe a analisar o proteoma da saliva de adolescentes com lesões de cárie em diferentes estágios de severidade, combinando métodos bioquímicos clássicos com os de última geração e utilizando análises qualitativas e quantitativas para investigar as diferenças relacionadas aos diferentes estágios da doença.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CÁRIE DENTÁRIA

O progresso de boa parte das doenças orais está relacionado à interação dos tecidos que compõem a cavidade oral e as bactérias que a habitam. Em especial, no caso das regiões do dente mais propensas à estagnação do biofilme dentário, essa interação está implicada na troca iônica que ocorre entre a porção mineral do dente e os fluidos orais (particularmente a saliva, o fluido da placa bacteriana e o fluido presente nos espaços intercristalinos do esmalte dentário). As bactérias relacionadas à cárie, organizadas sobre a superfície do dente na forma de biofilme dentário, consomem os açúcares fermentáveis provenientes da alimentação do hospedeiro humano, produzindo ácidos que diminuem o pH do meio no entorno dos dentes para valores abaixo de 5,5. Esse pH reduzido promove a dissolução da hidroxiapatita do esmalte em íons cálcio e fosfato, processo conhecido como desmineralização. Com o retorno do pH a valores acima de 5,5, ocorre a inversão desse processo com o ganho mineral por parte do esmalte, processo este chamado de remineralização. Caso haja um desequilíbrio dessas trocas iônicas favorecendo a desmineralização, com o tempo decorrido e a repetição desses episódios, ocorre o surgimento das lesões de cárie (Cury; Tenuta, 2009). Nessa fase inicial, a lesão é passível de paralisação sem que ocorra danos estruturais significativos aos tecidos dentais; porém, em estágios mais avançados, os danos estruturais se tornam irreversíveis, embora as lesões ainda sejam passíveis de serem paralisadas. As consequências mais severas do processo de formação e desenvolvimento das lesões cariosas sem intervenção odontológica adequada podem incluir dor, perda da qualidade de vida, desconforto na alimentação, limitações e incapacidade para outras atividades diárias (Biazevic et al., 2008; Baelum et al., 2011; Benzian et al., 2011).

A doença cárie possui alta prevalência em nível nacional e mundial. Dados do último levantamento epidemiológico publicado pelo Ministério da Saúde brasileiro em 2012 indicam que os índices CPO-D (número de dentes cariados cavitados, perdidos e obturados) de amostras populacionais estão diminuindo nas novas gerações, embora cerca de três entre quatro jovens de 15 a 19 anos, faixa etária correspondente

ao presente estudo, ainda apresentam sinais do acometimento dessa doença de acordo com esse índice.

Ao longo do tempo, foram desenvolvidos inúmeros sistemas e protocolos para a detecção de lesões de cárie, embora muitos se proponham a fazer a detecção das lesões somente em fases mais avançadas (Ismail, 2004). Sabendo-se que há uma maior facilidade de detecção por muitos profissionais odontológicos das lesões em fases avançadas de cárie, fases essas irreversíveis e de maior impacto para as pessoas, há uma grande importância de se concentrar os esforços no sentido de se desenvolver o correto diagnóstico das lesões em fases iniciais. Para esse fim, sistemas de classificação de lesões de cárie que contemplem também a detecção de lesões iniciais têm sido propostos e desenvolvidos (Pitts; Stamm, 2004; Gomez, 2015). O Sistema Internacional de Detecção e Avaliação de Cárie (ICDAS, do inglês International Caries Detection and Assessment System) é um sistema de classificação muito utilizado e com vários estudos comprovando a sua validade (Ismail et al., 2007). Além da detecção das lesões. A avaliação da atividade de cárie tem importância pois dá subsídios à tomada da decisão clínica de tratar ou somente acompanhar as lesões. Para esse fim, o método visual ainda é o único método validado para se classificar as lesões em ativas e inativas (Braga et al., 2010).

2.2 SALIVA

A saliva é o fluido que banha a cavidade oral, sendo o somatório de fluidos originados das glândulas salivares maiores e menores, fluido crevicular, contendo ainda células do hospedeiro, bactérias e restos alimentares. Ela é composta por mais de 99% de água e menos de 1% de eletrólitos e proteínas, que incluem sódio, fosfatos, potássio, magnésio, bicarbonato, proteínas como glicoproteínas, fosfoproteínas e enzimas, e compostos nitrogenados como ureia e amônia (Humphrey; Williamson, 2001; Bardow et al., 2011). A saliva possui diferentes funções como a regulação de pH por meio da função tampão, lubrificação, atua nos processos de remineralização do esmalte dental, combate à ação de microrganismos prejudiciais aos tecidos bucais, digestão, paladar, dentre outros (Humphrey; Williamson, 2001).

Ela possui fundamental importância na manutenção da homeostase da cavidade oral (Amerongen; Veerman, 2002).

A saliva é produzida pelas glândulas salivares, que são classificadas em maiores e menores. As glândulas salivares maiores são dispostas em três pares: parótidas, submandibulares e sublinguais, localizadas no vestíbulo oral (parótidas) e no assoalho da cavidade oral; já as glândulas salivares menores estão distribuídas em várias partes da mucosa oral e sua denominação é de acordo com a sua localização: labiais, vestibulares, palatinas, linguais e glossopalatinas (Bardow et al., 2011). Cada glândula salivar possui duas regiões, os ácinos, que secretam a chamada saliva primária, e os ductos, cujas células por meio de sua atividade adicionam ou retiram eletrólitos da saliva primária que por ele passa até se chegar à formação da saliva final, que é liberada na cavidade oral (Humphrey; Williamson, 2001).

O fluxo salivar é definido como a produção de saliva num dado intervalo de tempo e está relacionado com o clearance salivar, processo no qual a saliva dilui e elimina pela deglutição microrganismos e substâncias relacionadas aos processos patológicos dos tecidos orais como carboidratos fermentáveis, fluoretos ou ácidos (Lagerlof et al., 1987; Dawes, 2008; Duckworth; Jones, 2015). O fluxo salivar não estimulado tem valores de 0,3 a 0,4 ml/min e o fluxo de saliva estimulado entre menos de 2,0 ml/min até mais de 7,0 ml/min, dependendo do tipo de estimulação utilizado (Dawes, 2008). O fluxo salivar não estimulado tem valores de 0,3 a 0,4 ml/min e o fluxo de saliva estimulado entre menos de 2,0 ml/min até mais de 7,0 ml/min, dependendo do tipo de estimulação utilizado (Dawes, 2008). Essa estimulação da produção salivar para esse tipo de estudo é feita por estímulos mastigatórios, olfativos, tácteis, químicos ou gustativos (Humphrey; Williamson, 2001; Dawes, 2008; Proctor, 2016); valores de fluxo salivar maiores foram encontrados quando a estimulação foi feita com certos tipos de comida ou com ácido cítrico (Dawes, 2008). O fluxo de saliva estimulada aumenta de acordo com o aumento da idade em adolescentes (Söderling et al., 1993), porém sofre diminuição no decorrer dos anos na idade adulta (Affoo et al., 2015).

A regulação do pH da saliva é realizada pela capacidade tampão da saliva em conjunto com o clearance salivar. Os tampões funcionam como um reservatório de íons, dificultando o decréscimo do pH da solução quando ácidos são adicionados. Os sistemas tampão salivares mais importantes são o sistema bicarbonato-carbonato, o

sistema fosfato e o composto por proteínas salivares (Lagerlof; Oliveby, 1994; Van Nieuw Amerongen et al., 2004). O sistema bicarbonato-carbonato é mais atuante nas situações que ocorre o estímulo da produção salivar, enquanto que o sistema fosfato possui mais importância na saliva não-estimulada. O sistema tampão proteico possui menor importância que os sistemas tampão de bicarbonato-carbonato e fosfato e nele cada proteína funciona como tampão quando o pH do meio estiver mais alto ou mais baixo que o seu ponto isoelétrico (Bardow et al., 2011). Contudo, clinicamente, o sistema tampão de proteínas tem pouco impacto.

A contribuição de cada glândula para a formação da saliva total varia conforme o tipo de secreção. Para a saliva não-estimulada é de cerca de 28% pela parótida, 68% pela submandibular e pela sublingual em conjunto e cerca de 4% pelas glândulas salivares menores. Já considerando o fluxo de saliva estimulada, as proporções mudam para aproximadamente 53% das glândulas parótidas, 46% das sublinguais e submandibulares e menos de 1% das glândulas salivares menores (Proctor, 2016). A composição salivar varia conforme a glândula na qual é produzida: a secreção produzida pelas glândulas parótidas é mais fluida e rica em amilase enquanto que a secreção das glândulas salivares menores é mais viscosa e rica em mucina (Bardow et al., 2011).

O controle da secreção das glândulas salivares é feito pelos nervos aferentes ligados à língua, mucosa oral e ligamento periodontal e pelos dois sistemas nervosos eferentes autonômicos simpático e parassimpático (Proctor, 2016). O controle eferente da secreção salivar está ligado à qualidade e à quantidade de saliva produzida pelas glândulas, sendo que a estimulação simpática estimula a produção de saliva mais concentrada em proteínas e em menor volume enquanto que a estimulação parassimpática provoca produção de saliva menos concentrada e em maior volume (Proctor, 2016). Outro fator relacionado ao sistema nervoso que influencia no fluxo de saliva é o ciclo circadiano. Há variação no fluxo e na composição salivar nas diferentes horas do dia (Dawes, 1972; Ferguson; Fort, 1974), sendo assim de fundamental importância a coleta ser feita em horários previamente estabelecidos para se validar eventuais comparações.

2.3 PROTEÍNAS SALIVARES

A saliva total possui um grande número de peptídeos e proteínas, cada uma desempenhando funções biológicas específicas e ao mesmo tempo conjuntas. A composição e a concentração de proteínas na saliva variam de acordo com fatores como a glândula envolvida com a sua produção, a inervação atuante ou a estimulação (Dawes, 1969; Humphrey; Williamson, 2001; Bardow et al., 2011).

As proteínas salivares possuem três características que corroboram na complexidade do seu estudo juntamente com a formação de complexos: elas possuem multifuncionalidade, redundância e anfifuncionalidade (Levine, 1993). Essas duas primeiras características citadas significam que uma única molécula pode exercer mais de uma função na cavidade oral (multifuncionalidade), ao mesmo tempo em que a mesma função biológica pode ser exercida por mais de uma molécula (redundância). A anfifuncionalidade significa que a molécula pode agir de forma favorável ou contrária ao hospedeiro. Por exemplo, a alfa-amilase, quando suspensa na saliva, possui a capacidade de agregar certas espécies de bactérias para serem posteriormente deglutidas. Esta função pode favorecer o hospedeiro, mas também pode promover a aderência dessas mesmas bactérias sobre a superfície do esmalte, caso estejam ligadas à parte da película adquirida (Chaudhuri et al., 2007). Isto faz parte do início do processo de formação do biofilme dental. Como a alfa-amilase também possui a função de digerir moléculas de amido em formas menores de carboidratos como a maltose, esta situação poderia garantir fornecimento de alimento às bactérias cariogênicas desse biofilme e promover o desenvolvimento da doença cárie na sua persistência ao longo do tempo (Nikitkova et al., 2013). Entretanto as três características acima citadas possuem a comprovação mais fácil feita em estudos *in vitro* quando comparadas com estudos *in vivo*, podendo evidenciar que as condições do ambiente oral exerceriam influência na formação e no funcionamento dos inúmeros complexos proteicos salivares formados na cavidade oral (Amerongen; Veerman, 2002) incluindo modificações como glicosilação, fosforilação, degradação e outros tipos de interação proteicas (Helmerhorst; Oppenheim, 2007).

Alfa-amilase ou amilase salivar é a proteína mais abundante da saliva e possui a função primária de digerir amido em formas menores de carboidratos (Bardow et al., 2011). Possui grande diversidade de isoformas encontradas na saliva (Hirtz et al.,

2005; Bailey et al., 2012) e forma complexos com proteínas salivares de vários tipos (Soares et al., 2004; Moffa et al., 2015). A alfa-amilase possui capacidade de se ligar a certas espécies de *Streptococcus*, aglutinando-as e tornando mais fácil sua deglutição pelo hospedeiro se a alfa-amilase estiver suspensa na saliva ou facilitando a adesão das bactérias sobre a superfície dental, se a alfa-amilase estiver adsorvida fazendo parte da película adquirida sobre o esmalte (Chaudhuri et al., 2007; Nikitkova et al., 2013).

Mucinas são glicoproteínas de alto peso molecular, constituídas na saliva por dois tipos principais, MUC5B e MUC7. Elas possuem função de defesa física, criando uma barreira protetora sobre a superfície dos tecidos moles e duros, prevenindo o ataque de agentes nocivos, incluindo substâncias, vírus e bactérias. Também atuam na linha de defesa da saliva, ajudando a agregar bactérias, facilitando a posterior deglutição e remoção do ambiente oral. Elas também são capazes de mimetizar certos sítios de adesão por bactérias nas células da mucosa oral facilitando sua aglutinação e protegendo essas células de outra forma (Amerongen; Veerman, 2002).

Já as histatinas são peptídeos catiônicos de baixo peso molecular, ricas do aminoácido histidina. Elas estão relacionadas com processos variados como atividade antifúngica e antibacteriana, proteção do esmalte à desmineralização, neutralização de substâncias nocivas e inibição de processos inflamatórios (Oppenheim et al., 1988; Amerongen; Veerman, 2002; Kavanagh; Dowd, 2004; Siqueira et al., 2010; Fábíán et al., 2012). Três formas principais são encontradas nas secreções das glândulas salivares, as histatinas 1, 3 e 5, sendo que as duas primeiras são produzidas pela expressão dos genes HIS1 e HIS2 e a última é produto das modificações postranslacionais proteolíticas a partir da histatina 3 (Oppenheim et al., 2007). As histatinas são rapidamente degradadas no ambiente oral, embora sejam capazes de manter parte de sua atividade antifúngica nessas condições (Helmerhorst et al., 2006; Helmerhorst; Oppenheim, 2007). Foram encontradas evidências de que as histatinas ficam protegidas do processo de proteólise quando fazem parte da película adquirida do esmalte, mantendo a capacidade protetora contra a desmineralização do esmalte (Siqueira et al., 2010) e com potencial antifúngico quando ligada à hidroxiapatita (Vukosavljevic et al., 2012).

Cistatinas são inibidores de proteinases do aminoácido cisteína. Suas funções ainda não estão muito esclarecidas, porém supõe-se que estão relacionadas a

processos de desmineralização e remineralização por causa da sua capacidade de ligação com cálcio, e com doença periodontal, em especial a cistatina C, uma vez que tem se apresentado em concentrações mais elevadas nessa condição patológica (Isemura et al., 1984; Henskens et al., 1993; Baron et al., 1999). Seu papel com relação à doença cárie ainda não foi definido, mas especula-se que a atividade de cistatinas na saliva deva variar na cárie ativa, pois os níveis de catepsina, que é uma proteinase de cisteína, estão aumentados na atividade dessa doença (Levine, 2011; Nascimento et al., 2011). Um estudo usando eletroforese encontrou uma maior expressão densitométrica na faixa de proteínas de baixo peso molecular equivalente às das cistatinas em sujeitos que apresentavam lesões cavitadas de cárie quando comparadas à de sujeitos sadios; porém o conteúdo proteico dessas bandas não foi confirmado (Banderas-Tarabay et al., 2002).

Lisozimas são proteínas que apresentam atividade antimicrobiana (Amerongen; Veerman, 2002), atuando sobre certas peptidoglicanas da parede celular bacteriana, promovendo sua lise e facilitando a ação de outras enzimas antibacterianas (Fábián et al., 2012). Também possui capacidade de se ligar a lipopolissacarídeos bacterianos responsáveis pela destruição tecidual relacionada à reação inflamatória, inibindo a sua ação destrutiva e conferindo assim também ação protetora aos tecidos orais (Choi et al., 2011; Fábián et al., 2012).

Imunoglobulinas salivares conferem capacidade de proteção adquirida do hospedeiro frente a bactérias, seja inibindo a adesão das bactérias aos tecidos orais, seja facilitando a ação dos outros mecanismos de defesa. Seus principais tipos são denominados IgA, IgG e IgM e são produzidas por células plasmáticas localizadas no estroma das glândulas salivares maiores e menores, sendo transportadas em seguida para a saliva através das células acinares e ductais por receptores poliméricos de imunoglobulina (pIgR) juntamente com componentes secretórios (Tenovuo, 1998; Brandtzaeg, 2007). Alguns artigos mostraram correlação negativa entre níveis de IgA salivar relacionada a *Streptococcus mutans* e experiência de cárie (Bolton; Hlava, 1982; Bratthall et al., 1997), porém outros estudos não encontraram essa correlação (Watanabe et al., 1997; Koga-Ito et al., 2004).

Estaterina e proteínas ricas em prolina se relacionam com a inibição da precipitação espontânea de cálcio na saliva, já que esta é supersaturada com relação a esses sais (Bardow et al., 2011). Essas duas proteínas estão presentes na película

adquirida do esmalte e parecem participar da formação da mesma (Siqueira; Oppenheim, 2009) e também se relacionam com atividade antibacteriana e antifúngica, ao se ligar com glicoproteínas de bactérias cariogênicas, aglutinando-as para serem deglutidas posteriormente, e ao induzir a transição da *Candida albicans* de uma forma mais invasiva para uma menos agressiva (Fábián et al., 2012). Apesar de rapidamente degradada na saliva (Helmerhorst et al., 2010), a estaterina se mantém intacta ao longo do tempo quando ligada à superfície do esmalte como parte da película adquirida (Lee et al., 2013). Uma característica que destaca a estaterina de outras proteínas é a de possuir dois mecanismos distintos de controle dos fosfatos de cálcio na saliva, um pela inibição da precipitação espontânea dos sais de cálcio na saliva e outro dificultando crescimento dos cristais de cálcio (Huq, 2007). Por essa razão, ela é considerada o principal fator da capacidade de remineralização da saliva humana (Oppenheim et al., 2007). Por sua vez, as proteínas ricas em prolina estão relacionados com a presença de cárie dental. Sujeitos livres de cárie foram relacionados a atividade dos genes que controlam a produção de certos tipos de proteínas ricas em prolina básicas (Levine, 2011), além do que proteínas ricas em prolina ácidas possuem forte adesão à hidroxiapatita e uma forte capacidade de inibir o crescimento de cristais de fosfato de cálcio, podendo desta forma promover o controle da remineralização do esmalte (Johnsson et al., 1993). Porém a estaterina e as proteínas ricas em prolina possuem capacidade anfifuncional, ao se ligar a bactérias, agregando-as e facilitando a deglutição pelo hospedeiro mas também facilitam a adesão de bactérias nocivas como *Actinomyces viscosus* à hidroxiapatita do esmalte (Gibbons; Hay, 1988).

2.4 MÉTODOS DE ANÁLISES PROTEÔMICAS EM SALIVA

2.4.1 Concentração de proteínas total

A mensuração da concentração de proteínas total de uma solução-teste consiste em promover uma reação com determinados reagentes, cuja coloração de seus produtos é quantificada por espectrometria de absorção e comparada com a de

soluções de referência de concentrações pré-estabelecidas (Walker, 2007). Métodos que utilizam esse princípio são também conhecidos como métodos colorimétricos. Três dos métodos colorimétricos mais comuns de se mensurar a concentração de proteínas total são os métodos de Bradford, o método de Lowry e o método de Smith ou do ácido bicinconínico (BCA). O método de Bradford consiste na reação da solução-teste com azul-de-Coomassie G250 confrontado às soluções-padrão de albumina sérica bovina e lisozima. Porém, este método é muito dependente das ligações promovidas entre o azul-de-Coomassie e as proteínas, podendo levar a resultados subestimados no caso de se obter uma reação com menor rendimento pelo tipo de aminoácido nela contido (Lovrien; Matulis, 2001). Os métodos de Lowry e do BCA utilizam a reação de íons de cobre com as ligações peptídicas das proteínas (Walker, 2007). No método de Lowry, a reação proteína-íons de cobre é com o azul de heteropolimolibdênio, e essa é a cor do seu produto, cuja absorção é medida a 550nm (Walker, 2007). Já o método do BCA consiste na reação do seu reagente com a solução-teste contendo proteínas, resultando em um produto de cor roxa, que é mensurada a 562nm (Smith et al., 1985). As vantagens do método do BCA sobre o de Lowry se devem a melhor tolerância do primeiro com relação a substâncias como tampões, drogas, ácidos nucleicos e açúcares, além da maior facilidade de operação, com menos passos operatórios (Walker, 2007).

A concentração de proteínas salivares encontrada na literatura de indivíduos sadios ou acometidos por diferentes condições patológicas varia em mais de 200% (Banderas-Tarabay et al., 2002; Shimotoyodome et al., 2007; Roa et al., 2008; Shaila et al., 2013; Vibhakar et al., 2013). Estudos mostraram que estímulos gustativos ácido, doce ou amargo promovem a diminuição da concentração de proteínas da secreção parótida e a estimulação mastigatória a diminuição da concentração de proteínas na saliva total em aproximadamente 25% a 30% após cerca de três a quatro minutos, mantendo-se constante nesse patamar mais baixo enquanto foi mantida a estimulação (Dawes, 1984; Rayment et al., 2001). Adultos possuem uma concentração de proteínas total na saliva maior que a de crianças, indicando que há um processo de desenvolvimento e maturação das glândulas salivares durante o processo de crescimento da criança (Tenovuo et al., 1986).

2.4.2 Eletroforese

Eletroforese é um método analítico de separação de proteínas baseado na atração de moléculas carregadas eletricamente em resposta ao campo elétrico do meio, resultando na sua separação. Essa separação está relacionada com diversos fatores como peso, tamanho e forma molecular, cargas moleculares dentre outros (Walker, 2007). A eletroforese pode ser classificada em dois tipos principais: os métodos desnaturantes e os nativos.

Um exemplo de método desnaturante é a eletroforese em gel de poliacrilamida adicionado de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE, do inglês sodium-dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) (Laemmli, 1970). Este é um método analítico cuja separação de proteínas desnaturadas ocorre de acordo com seu peso molecular, podendo inclusive ser utilizada como método de filtragem de proteínas (Walker, 2007). Ele se baseia no fato de que, durante a preparação, a amostra é submetida aos reagentes e à fervura, que promovem a desnaturação e dissociação de proteínas, na qual as estruturas secundárias, terciárias e quaternárias das proteínas são rompidas, deixando as mesmas somente com a estrutura primária, que está relacionada com a sequência de aminoácidos (Lehninger et al., 2011). Exemplos de reagentes que são utilizados nesse protocolo e que promovem a desnaturação das proteínas são o ditioneitol (também conhecido por DTT) e o β -mercaptoetanol (Walker, 2007). O dodecil sulfato de sódio liga-se a essas moléculas de proteínas de forma consistente, deixando-as com formato retilíneo e carregando-as eletricamente de forma proporcional ao seu tamanho molecular. Desta maneira, a separação molecular promovida no processo da SDS-PAGE se baseia no tamanho das moléculas, sendo possível estimar o seu peso molecular se forem utilizadas soluções de referência com proteínas de pesos moleculares conhecidos (Walker, 2007). A quantificação das proteínas é feita pela intensidade da cor das respectivas bandas na imagem obtida do gel de eletroforese, para isso diferentes trabalhos reportam o uso de programas específicos para análise densitométricas de géis de eletroforese como o BioRad Image Lab ou o uso de softwares gráficos com recursos de medição de intensidade de cor como por exemplo o Adobe Photoshop (McDonald et al., 2011; Davies et al., 2014).

Os métodos nativos são utilizados quando o objetivo for identificar alguma proteína por meio de propriedades biológicas como atividade enzimática, ligações de receptores e de anticorpos ou a presença de complexos e cargas elétricas positivas ou negativas. Como no decorrer do seu processamento a solução a ser estudada não é submetida a agentes desnaturantes químicos e nem ao calor, as proteínas são submetidas à atração eletroforética em sua forma original, sendo separadas por outros fatores que não o peso molecular (Walker, 2007). No caso específico da eletroforese em gel nativo para separação das proteínas salivares carregadas eletricamente, os géis nativos catiônicos são utilizados para o estudo das proteínas catiônicas, especialmente as histatinas e outras proteínas ricas em histidinas (Oppenheim et al., 1988). A diferença principal para a SDS-PAGE, além do fato de se realizar a eletroforese com as proteínas em sua forma nativa, é que o sistema eletroforético é montado de forma que o catodo (polo negativo) fique na posição inferior. O gel de poliacrilamida e as soluções-tampão também são específicos para esta técnica, sendo que a solução-tampão superior (interna ao cassete) é diferente da inferior, que fica exteriormente ao cassete, sendo assim classificada como método descontínuo de eletroforese (Baum et al., 1977).

Os métodos eletroforéticos no geral possuem algumas limitações, podendo ser ligadas à seleção dos reagentes, à concentração de poliacrilamida no gel ou na seleção do método de coloração para revelar as bandas eletroforéticas (Hjemeel; Chrambach, 1981; Sallantin et al., 1990; Walker, 2007). A separação obtida com a eletroforese, obtida por uma única característica da molécula como peso ou cargas moleculares, fazendo com que moléculas diferentes estejam dispostas no mesmo nível após a separação eletroforética, também pode ser considerada uma limitação (Lamy et al., 2012), mas esta pode ser contornada com a combinação de métodos bidimensionais, como a eletroforese 2D, que combina a primeira dimensão utilizando a separação pelos diferentes pontos isoelétricos das proteínas da solução e a separação proteica na segunda dimensão feita pela diferença de pesos moleculares utilizando o SDS-PAGE (Walker, 2007). Outra combinação é a de se utilizar a SDS-PAGE como método de separação proteica por peso molecular em primeira dimensão para a subsequente identificação e caracterização das bandas por espectrometria de massa na segunda (Aebersold; Goodlett, 2001; Shevchenko et al.,

2007). Esta última abordagem permite uma maior sensibilidade da análise espectrométrica (Aebersold; Mann, 2003).

A respeito dos trabalhos encontrados sobre eletroforese de saliva, uma dificuldade quando da utilização dos métodos nativos é causada pela presença de mucina, que com seu alto peso molecular e a alta capacidade de formar complexos com outras moléculas, pode impedir que outras moléculas atravessem os poros do gel de eletroforese nativa (Lamy et al., 2012). Métodos nativos de eletroforese foram utilizados para identificar e caracterizar proteínas e seus complexos como os da amilase, histatinas e outras proteínas ricas em histidina na saliva (Oppenheim et al., 1988; Bank et al., 1991; Driscoll et al., 1995; Helmerhorst et al., 2006; Siqueira et al., 2010; Moffa et al., 2015). Já os trabalhos encontrados sobre a SDS-PAGE em saliva relatam diferenças em certas bandas proteicas de diversas mobilidades eletroforéticas quando amostras de saliva de indivíduos sadios foram comparados a amostras de indivíduos acometidos por doenças orais como a cárie (Banderas-Tarabay et al., 2002; Vitorino et al., 2006; Roa et al., 2008), ou em condições sistêmicas que possam ter repercussão na composição proteica da saliva (Hirtz et al., 2006; Rudney et al., 2009; Xiao et al., 2012).

2.4.3 Espectrometria de massa

A espectrometria de massa é um método analítico no qual as moléculas de interesse são ionizadas e estes íons produzidos são separados de acordo com a relação massa/carga (m/z) e detectados proporcionalmente pela sua abundância, produzindo um espectro contendo essas informações (De Hoffmann; Stroobant, 2007). É um método que está indicado e é bastante utilizado para estudos de identificação, caracterização e quantificação de proteínas (Aebersold; Goodlett, 2001). No entanto, como esses equipamentos possuem limitação na identificação de moléculas proteicas de alto peso molecular, estas devem ser fracionadas em peptídeos, que são moléculas menores, para se identificar o seu conteúdo, por exemplo, utilizando a digestão de proteínas utilizando tripsina (Aebersold; Mann, 2003).

Existe um número de equipamentos que se utilizam de diferentes mecanismos para alcançar esse princípio, sendo que dois dos mais comuns são o MALDI-TOF e o LC-ESI-MS. Esses dois conjuntos de equipamentos de ionização e análise dos íons diferem nos princípios de funcionamento e possuem uma indicação mais adequada de acordo com a natureza, sendo o MALDI mais adequado para soluções peptídicas mais simples e o LC-ESI-MS para amostras proteicas mais complexas. A ionização por dessorção a laser assistida por matriz (MALDI - do inglês Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization), utiliza uma matriz que auxilia a molécula proteica ser sublimada e ionizada por um feixe laser. Os íons são então atraídos e acelerados numa câmara com trajeto curvo, sendo identificados pela medição do tempo que o íon leva para percorrer a distância entre a matriz e o detector, de onde vem a denominação TOF, do inglês Time of Flight (tempo de voo). Quanto maior a molécula, maior a energia cinética ao se contornar a curva na câmara do equipamento e assim, maior o tempo para alcançar o detector. Já o LC-ESI-MS utiliza a cromatografia líquida (em inglês Liquid Chromatography ou LC) como método de separação das inúmeras moléculas proteicas de diferentes pesos moleculares, seguida de um eletrospray para injeta-las no interior da câmara de espectrometria de massa (MS, do inglês mass spectrometry). Lá dentro, as gotículas desse spray são ionizadas e estes íons são detectados por sua relação da intensidade pela massa/carga (m/z). Alguns equipamentos, como o que foi utilizado no presente estudo, realizam uma segunda análise de espectrometria de massa logo na sequência da primeira para aumentar sua resolução nas áreas de interesse, por essa razão esses equipamentos são denominados LC-ESI-MS/MS ou “tandem” (Aebersold; Mann, 2003). A identificação de proteínas a partir dos espectros gerados por esse tipo de equipamento leva em consideração o número de fragmentos de íons que coincidem com os aqueles encontrados no banco de dados, sua abundância na amostra estudada, o número e o tipo de aminoácidos da sequência para identificar por semelhança com os dados armazenados. Esses valores são inseridos numa fórmula cujo resultado é um score ou ion score dessa sequência (Eng et al., 1994), que combinados resultam num valor referente à proteína identificada. De acordo com esta definição, o valor de ion score pode ser usado para quantificar proteínas, usando de certa precaução, pois esse valor possui referência ao grau de confiança da correlação dos espectros encontrados com os constantes do bando de dados, pois a busca e identificação se baseia em métodos probabilísticos (MacCoss et al., 2002).

A quantificação de proteínas nos métodos de LC-ESI-MS pode ser realizada através de métodos que utilizam ou não marcadores químicos (label ou label-free methods). Os marcadores químicos utilizados nos primeiros métodos são substâncias químicas ou tags que se ligam a determinadas moléculas ou ligações da proteína durante o desenvolvimento celular ou por ocasião do processamento laboratorial da amostra. Ao serem analisados na espectrometria de massa, essas substâncias emitem um sinal específico nos espectros, que assim podem ser quantificados. Esses métodos, porém, demandam de mais recursos laboratoriais, tempo e pessoal especializado, tornando-os caros de serem realizados (Siqueira; Dawes, 2011). Já os label-free methods não utilizam tais substâncias, sendo assim mais baratos e rápidos de serem realizados, e baseiam sua comparação nos cromatogramas ou nos espectros das soluções estudadas, assumindo uma consistência nas condições de processamento das amostras e da coleta de dados. Dessa forma, esses softwares, como por exemplo, o SIEVE (Thermo Fisher Scientific Inc., San Jose, CA, EUA), fazem a comparação de uma amostra a ser estudada com uma de referência produzindo dados relativos de quantificação de determinadas proteínas dessas duas soluções (Aebersold; Mann, 2003; Tabata et al., 2007; DeSouza; Siu, 2013).

3 PROPOSIÇÃO

O presente estudo tem por objetivo principal analisar o proteoma da saliva de adolescentes com e sem lesões cariosas ativas em diferentes estágios de severidade, combinando métodos bioquímicos clássicos, como a concentração de proteínas total e eletroforese em gel de poliacrilamida adicionado de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) e gel nativo catiônico, com métodos de última geração, como a espectrometria de massa.

Como objetivos secundários, este estudo se propõe a definir parâmetros ótimos de eletroforese SDS-PAGE a serem utilizados para a análise de proteínas salivares e a verificar as diferenças quantitativas das proteínas encontradas na saliva dos adolescentes que possuem lesões de cárie ativas em fase inicial daqueles que não possuam lesões de cárie ativas utilizando diferentes abordagens de análises densitométricas das bandas do gel SDS-PAGE e escores de espectrometria de massa.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Ciências da Saúde envolvendo Seres Humanos da University of Western Ontario (Revisão número 16181E). O projeto correspondente também foi apreciado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (parecer número 803.821) e pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP, parecer número 913.428). A cópia dos documentos está exibida nos anexos A, B e C, respectivamente.

4.2 PARTICIPANTES DA PESQUISA

Doze adolescentes com idades entre 12 e 18 anos de idade foram selecionados para este estudo. Critérios de inclusão envolviam jovens com boas condições gerais de saúde, dentição permanente exclusiva e que não apresentavam sinais de doença periodontal. Critérios de exclusão envolviam jovens e pais que não concordaram em assinar os respectivos termos de assentimento e consentimento livre e esclarecido e jovem que haviam tomado antibióticos sistêmicos nos três meses imediatamente anteriores à data de coleta de saliva.

A análise dos participantes do estudo e das amostras de saliva foi dividida em seis partes para melhor apresentação dos resultados. A parte I consistiu na caracterização dos participantes do estudo e das amostras utilizadas e foi feita concomitantemente com a seleção dos participantes nos diferentes grupos. A parte II consistiu no desenvolvimento dos parâmetros laboratoriais de análise e as partes III a VI consistiram no conjunto das análises das amostras de saliva utilizando as diferentes técnicas proteômicas abordadas neste estudo.

4.3 PARTE I: CARACTERIZAÇÃO DOS PARTICIPANTES DO ESTUDO E DAS AMOSTRAS UTILIZADAS

4.3.1 Exame clínico

Primeiramente, os jovens participantes do estudo foram levados a um consultório odontológico e submetidos a uma limpeza profilática com taças de borracha movidas por uma peça de mão odontológica de baixa velocidade e o auxílio de uma pasta feita com pedra-pomes em pó e água. Este passo operatório teve como objetivo a remoção da possível interferência causada por biofilme bacteriano e outros depósitos sobre a superfície dos dentes no diagnóstico do estágio e atividade das lesões de cárie sem que houvesse contaminação por parte de componentes de pastas profiláticas comercialmente disponíveis. Todos os exames clínicos foram realizados pelo mesmo operador (EKK), que tinha sido passado previamente em treinamento do método diagnóstico de lesões de cárie. Um quadrante foi examinado por vez, sob a iluminação da cadeira odontológica, primeiramente com os dentes úmidos e em seguida secos com um jato de ar para assegurar o correto diagnóstico da atividade e do estágio das lesões cariosas. O processo diagnóstico seguiu os critérios do sistema internacional de detecção e avaliação de lesões de cárie (conhecido por ICDAS) para avaliação das lesões cariosas e do sistema LAA (avaliação da atividade das lesões de cárie) para avaliação da atividade, conforme trabalhos encontrados na literatura (Ismail et al., 2007; Braga et al., 2010).

Neste estudo, a classificação das lesões de cárie ativa levou à sua divisão em dentes sadios, que não apresentaram lesões cariosas nas suas superfícies (escore 0 do ICDAS), dentes com lesões em estágios iniciais de lesões não cavitadas, cujo esmalte apresentou cor branca opaca e superfície rugosa ao serem sondadas por instrumento de ponta romba (lesões ativas classificadas como escore 1 e 2 pelo ICDAS) e dentes com lesões cavitadas, com exposição de dentina com consistência amolecida (lesões ativas com escores ICDAS 5 e 6).

Terminado o exame, os jovens participantes foram divididos em três grupos, sendo o primeiro com quatro jovens apresentando quatro ou mais lesões ativas de cárie em dentina em estágio avançado (grupo CA - lesões ativas cavitadas), o

segundo com quatro jovens apresentando quatro ou mais lesões ativas de cárie em estágios iniciais ou em fase de mancha branca no esmalte (grupo MB – lesões ativas em fase inicial) e o terceiro grupo com quatro jovens que não apresentavam lesões ativas de cárie (grupo CO - controle). Possíveis diferenças entre os grupos relacionadas a sexo e idade foram avaliadas pelos testes de qui-quadrado e de análise de variância, respectivamente.

4.3.2 Coleta de saliva

Após o exame clínico, os jovens foram liberados por duas horas, período no qual foram solicitados a não ingerir qualquer tipo de produto, exceto água. Todas as amostras de saliva foram coletadas pelo mesmo operador (EKK), no mesmo horário (entre 10:30 e 11:15 da manhã) e no mesmo local, para tentar evitar possíveis interferências nos resultados devido a fatores como ciclo circadiano. Na coleta, 15 ml de saliva estimulada por um pedaço de 5x5cm de Parafilm® (Bemis Inc, Neenah, EUA) foi coletada de cada jovem em um tubo falcon de 50 ml, mantido em gelo para diminuir a possível degradação proteica. O tempo de coleta da saliva foi mensurado para o cálculo do fluxo salivar. Após a coleta, as amostras de saliva foram imediatamente levadas a um freezer para congelamento em uma temperatura de -80 °C. Posteriormente, as amostras foram liofilizadas até o momento da análise. Toda a parte experimental deste estudo foi desenvolvida no laboratório de análises bioquímicas em saliva na Universidade de Western Ontario. Os dados do fluxo de saliva foram analisados estatisticamente usando análise de variância.

4.4 PARTE II: DESENVOLVIMENTO DOS PARÂMETROS DOS EXPERIMENTOS LABORATORIAIS E CARACTERIZAÇÃO INICIAL DAS AMOSTRAS COLETADAS DE SALIVA

4.4.1 Experimento 1: Concentração de proteína total

Para as análises da saliva coletada, as amostras foram reidratadas com 15 ml de água ultrapura, os tubos agitados por 30 segundos e a saliva dividida em alíquotas de 1 ml em tubos de microcentrífuga com capacidade para 1,7 ml. Cada alíquota foi centrifugada a 14.000 $\times g$ por 20 minutos e teve o sobrenadante transferido para um novo tubo. Em seguida, as amostras de sobrenadante foram submetidas à mensuração da concentração de proteína total, utilizando o método colorimétrico de reação com ácido bicinconínico (BCA Protein Assay, Pierce Biotechnology, Rockford, EUA). Para essa análise, nove soluções-padrão de albumina sérica bovina em concentrações crescentes pré-estabelecidas de 0 a 2000 $\mu g/ml$ foram adicionadas ao reagente do BCA em duplicata para se construir a curva de calibração ao lado das amostras de saliva a serem estudadas e colocadas para reagir por trinta minutos. A absorbância foi então medida por um espectrômetro específico (iMark Microplate Reader, Bio-Rad Inc., Hercules, EUA) e os dados encontrados foram exportados para o programa Microsoft Excel 2013 (Microsoft Inc., Redmond, EUA). Nele, foi construída uma curva de calibração feita com as médias dos valores de absorbância de cada uma das concentrações de soluções-padrão, na qual foram extraídos o coeficiente de determinação R^2 e a equação de primeiro grau correspondente. O critério adotado para a validação da análise foi encontrar o valor do coeficiente de determinação R^2 dessa curva de calibração acima de 0,99 e a equação de primeiro grau foi utilizada para se calcular a concentração de proteínas de cada amostra. Os dados da concentração de proteína total foram analisados estatisticamente pela análise de variância.

Após obtidos os resultados e feitos os cálculos necessários, alíquotas contendo 20 μg de proteínas salivares foram preparadas em novos microtubos e desidratadas em evaporador rotativo (Vacufuge Plus, Eppendorf, Hamburg, Germany), sendo mantidas a -20 °C até o uso nos experimentos posteriores.

4.4.2 Experimento 2: Determinação da quantidade de proteínas salivares para separação eletroforética

Neste experimento para determinação dos padrões de eletroforese, foi usada saliva de três indivíduos de ambos os sexos, não participantes do estudo principal, com boas condições de saúde geral e oral e idades entre 35 e 37 anos. Após a medição das concentrações de proteína total, as amostras de saliva foram misturadas para se fazer um pool contendo quantidades iguais de proteínas salivares. Foram feitas alíquotas de 15 µg, 20µg, 25 µg e 30µg a partir desses pools, que foram desidratadas em evaporador rotativo e conservadas em congelador a -20 °C até o momento do experimento.

Essas amostras foram ressuspensas com 20µL de uma solução-tampão composta por dodecil sulfato de sódio (SDS) a 2%, ditioneitol (DTT) a 165 mM, glicerol a 20%, tris (hidroximetil) aminometano a 20 mM ajustado a pH 6,8 com ácido hidroclorídrico (Tris-HCl), ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) a 2 mM, azul de bromofenol a 0,1mg/ml e 5mM de beta-mercaptoetanol (BME). Em seguida essas ressuspensões foram fervidas por cinco minutos.

Após o resfriamento à temperatura ambiente, cada ressuspensão foi carregada em um poço de um gel de poliacrilamida a 12% (gel de separação) e a 4% (gel de carregamento), contendo dodecil-sulfato de sódio, montado em um conjunto minigel de eletroforese Mini Protean (Bio-Rad Inc., Hercules, EUA). 5 µL de Precision Plus All Blue (Bio-Rad Inc., Hercules, EUA) foi carregado no primeiro poço de cada gel para servir de padrão de referência. O processo de eletroforese seguiu o método de Laemmli, tendo como parâmetros temperatura ambiente de 22 °C e corrente de 100 V por cerca de duas horas. Depois de a frente de proteínas alcançar a parte inferior do gel (aproximadamente 0,5 cm para o final do gel), a corrente elétrica foi desligada, as placas de vidro do minigel separadas e o gel nela contido foi retirado e corado à temperatura ambiente por cerca de duas horas utilizando uma solução aquosa específica para géis SDS-PAGE contendo azul de Coomassie G250 a 0.2%, metanol a 40% e ácido acético a 10%. A etapa de descoloração usou solução aquosa de metanol a 40% e ácido acético a 10% por aproximadamente 16 horas até que o gel estivesse suficientemente descolorido, sendo em seguida, mantido em água ultrapura.

As imagens do gel foram obtidas usando um digitalizador dedicado Bio-Rad ChemiDrop MP (Bio-Rad Inc., Hercules, EUA), conectado a um computador contendo o programa Image Lab 5.2 (Bio-Rad Inc., Hercules, EUA), sendo em seguida exportadas para o formato JPG.

O critério para seleção da quantidade de proteínas salivares foi o equilíbrio da coloração das bandas de alta e de baixa densidade eletroforética, obtendo imagens nítidas com a mesma quantidade de proteínas nessas duas condições.

4.4.3 Experimento 3: Determinação da composição da solução tampão de ressuspensão das amostras

Este experimento utilizou quatro alíquotas de 20 µg de proteínas salivares provenientes do mesmo pool utilizado no experimento anterior divididas em dois grupos, um utilizando solução-tampão adicionado de 5mM de BME e outro adicionado de 5 mM de DTT. A solução-tampão base tinha a mesma composição, que segue: SDS a 2%, DTT a 165 mM, glicerol a 20%, Tris-Cl a 20 mM ajustado a pH 6,8, EDTA a 2 mM e azul de bromofenol a 0,1mg/ml. As amostras foram ressuspensas com 20 µl de cada solução-tampão, agitadas e fervidas por cinco minutos. Os parâmetros e procedimentos da eletroforese deste experimento seguiram os mesmos do experimento anterior, com a eletroforese sendo conduzida num gel de SDS-PAGE contendo poliacrilamida a 12% (gel de separação) e a 4% (gel de carregamento) e utilizando 5 µL de Precision Plus All Blue (Bio-Rad Inc, Hercules, EUA) carregado no primeiro poço do gel como padrão de referência. O processo de eletroforese foi conduzido desta vez com voltagem de 80 V e os outros parâmetros foram os mesmos já descritos anteriormente. A coloração foi realizada utilizando a solução para SDS-PAGE contendo de azul de Coomassie G250 a 0,2%, metanol, ácido acético e água ultrapura na proporção 40:10:50. Após a descoloração com metanol, ácido acético e água ultrapura na proporção 40:10:50, o gel foi mantido em água ultrapura até o momento de registro das imagens, que foi obtida usando o digitalizador dedicado Bio-Rad ChemiDrop MP conectado a um computador contendo o programa Image Lab 5.2, sendo em seguida exportadas para o formato JPG.

O critério para seleção da quantidade de proteínas salivares foi separação eletroforética obtida no conjunto das bandas utilizando-se cada uma das soluções-tampão.

4.5 PARTE III: ANÁLISES POR ELETROFORESE COM GEL NATIVO CATIÔNICO

O experimento desta parte do presente estudo utilizou as alíquotas de 20 µg preparadas no experimento 1 da parte II (seção 4.4.1). O método eletroforético deste experimento utilizou um gel específico, preparado em duas fases: o gel de separação e o gel de carregamento, cada um contendo concentrações diferentes de poliacrilamida e polimerizados por luz incandescente de 120 V, a 100 e 60 W, respectivamente. Os géis foram montados no conjunto minigel de eletroforese Mini Protean (Bio-Rad Inc., Hercules, CA, EUA), carregados com as proteínas salivares ressuspensas em 20 µl de uma solução tampão aquosa contendo 4 g de sacarose, 4 mg verde metil e volume final de 10ml. Sendo um método nativo, as proteínas ressuspensas não são fervidas, sendo carregadas no gel de eletroforese após a ressuspensão. A ressuspensão de 4 µg de cada uma das histatinas 1, 3 e 5 foi realizada em 20 µl da solução-tampão utilizada, para servir como padrão de comparação. A eletroforese foi montada para que as proteínas catiônicas fossem atraídas do anodo localizado na parte superior para o catodo localizado na parte inferior do gel, utilizando voltagem de 100 V por um tempo de aproximadamente 2,5 horas. As amostras ressuspensas foram carregadas nos géis em poços contíguos. Cada amostra de saliva foi submetida a três experimentos independentes de eletroforese e cada grupo foi disposto em um único gel.

Após ser observado que as proteínas tinham alcançado a parte inferior do gel, a corrente elétrica foi interrompida, as placas de vidro do minigel separadas e o gel fixado por 30 minutos com ácido tricloroacético a 20%, corado por uma hora em uma solução aquosa específica para gel nativo catiônico, contendo azul de Coomassie G250 a 0,1%, metanol a 8% e ácido acético a 7% em temperatura constante de 60 °C. Em seguida, os géis foram descoloridos com metanol, ácido acético e água na proporção 40:10:50 até que as imagens ficassem nítidas. Os géis foram conservados

em água ultrapura até que a realização do registro das imagens e a coloração de prata subsequente.

Após o registro da imagem dos géis corados com azul de Coomassie, os mesmos foram submetidos à coloração de prata, que seguiu o protocolo sugerido pela Thermo Scientific (Rockford, EUA). As etapas consistiram na fixação com solução aquosa de etanol e ácido acético (50% e 5% respectivamente), a coloração propriamente dita por 30 minutos, o banho com solução de redução até a visualização das principais bandas, e o banho de estabilização por um tempo aproximado de uma hora, sendo que entre um passo operatório e outro o gel foi lavado com água ultrapura. Da mesma forma, o gel foi mantido em água ultrapura até o registro de imagens no equipamento específico Bio-Rad ChemiDrop MP e as análises posteriores.

4.5.1 Preparação para espectrometria de massa das bandas eletroforéticas do gel nativo catiônico

Para a identificação das proteínas localizadas nas bandas equivalentes à histatinas 1, 3 e 5 do gel, o gel foi medido e cortado com uma lâmina de bisturi cirúrgico número 21 (Medblade Ltda., Manaus, Brasil) e os fragmentos colocados em microtubos de 1,7ml. Os fragmentos de gel foram cortados com uma tesoura fina em pedaços menores, de 1 a 2 mm e sobre esses fragmentos foi adicionado uma solução descolorante contendo tiosulfato de sódio a 100 mM e ferrocianeto de potássio a 30 mM em volumes iguais por 15 minutos e lavados com bicarbonato de amônio a 25mM em acetronitrila a 50% por duas vezes de 10 minutos. A digestão no gel de poliacrilamida (digestão “in-gel”) foi feita com 12 µL de solução de tripsina concentrada a 1 µg/ 0,1 ml e 25 µL de bicarbonato de amônio a 25 mM por 16 horas a 37 °C. Terminado o tempo de digestão das proteínas, 10 µL de ácido fórmico a 1% foi adicionado e após 30 minutos toda a fase líquida foi transferida para um novo tubo. O líquido contendo as proteínas digeridas foi submetido à secagem com evaporador rotativo e à remoção de sais com microcolunas de fase reversa (C-18 Zip-Tips®, Millipore, Billerica, EUA) para ser submetido a análise por espectrometria de massa.

4.5.2. Análise por espectrometria de massa e identificação das proteínas

O equipamento usado neste estudo foi um LTQ-Orbitrap Velos (Thermo Scientific, San Jose, EUA). A fase de cromatografia líquida do equipamento possui coluna de 100 mm por 75 μ m embalada no próprio laboratório, por resina C-18 com esferas de 3 μ m e poros de 100 Å (Michrom BioResources, Auburn, EUA). A fase de eletrospray do equipamento possui um gama de valores de massa/carga (m/z) entre 390 e 2000. O critério de exclusão dinâmico utilizado foi estipulado como contagem repetida de valor de 1 e a duração de 30 segundos.

As amostras desidratadas foram ressuspensas com 15 μ L de uma solução composta por água deionizada a 97,5%, acetonitrila a 2,4% e ácido fórmico a 0,1% e em seguida inseridas no equipamento. A fase de cromatografia líquida foi desenvolvida por um gradiente formado por 85 minutos de 0 a 100% do solvente B, formado por acetonitrila a 97,5% e de ácido fórmico a 0,1%, com fluxo de 200 nL/min e pressão máxima de 280 bar. Parâmetros de voltagem do eletrospray e temperatura do capilar de transferência iônica foram 1,8 kV e 250 °C, respectivamente.

Os espectros medidos pelo equipamento utilizado foram confrontados com valores de outros estudos e constantes em banco de dados do proteoma humano (Swiss Prot and TrEMBL, Swiss Institute of Bioinformatics, Geneva, Switzerland, <http://ca.expasy.org/sprot/>) usando os algoritmos SEQUEST e TrEMBL (Swiss Institute of Bioinformatics, Geneva, Switzerland, <http://ca.expasy.org/sprot/>) no software Proteome Discoverer 1.3 (Thermo Scientific, San Jose, EUA). Estratégias de análise de dados para filtrar os resultados de busca incluíram taxa de falsa descoberta de 1% e a identificação em todas as três análises por banda de cada participante. Foram permitidos o máximo de duas clivagens errôneas: carbamidometilação de cisteína, e fosforilação de serina, treonina e tirosina. A oxidação de metionina foi considerada como modificação dinâmica. As listas geradas foram visualizadas e as diferentes formas de queratina encontradas foram eliminadas da lista por serem consideradas possíveis contaminantes (Siqueira et al., 2007).

Os arquivos resultantes contendo as listas das proteínas identificadas foram comparadas construindo-se diagramas de Venn com uma ferramenta baseada em rede (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>) para identificar as proteínas

em comum nas três repetições de cada banda e nas amostras de saliva de diferentes sujeitos em cada grupo.

4.6 PARTE V: SEPARAÇÃO ELETROFORÉTICA POR SDS-PAGE, IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO CONTEÚDO PROTEICO DE SUAS BANDAS

4.6.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida adicionada de dodecil sulfato de sódio

Para a realização do gel de poliacrilamida adicionada de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE, do termo em inglês sodium dodecyl-sulphate polyacrylamide gel electrophoresis), cada alíquota de saliva foi ressuspensa com 20 µL de uma solução-tampão composta por SDS a 2%, DTT a 165 mM, glicerol a 20%, Tris-Cl a 20 mM ajustado a pH 6,8, EDTA a 2 mM e azul de bromofenol a 0,1mg/ml e fervida por cinco minutos. Após o resfriamento à temperatura ambiente, cada ressuspensão foi carregada em um poço de um gel de poliacrilamida contendo SDS a 12% (gel de separação) e a 4% (gel de carregamento), montado em um conjunto minigel de eletroforese Mini Protean (Bio-Rad Inc., Hercules, EUA). Após, 5 µL de Precision Plus All Blue (Bio-Rad Inc., Hercules, CA, EUA) foi carregado no primeiro poço de cada gel para servir de padrão de referência. O processo de eletroforese seguiu o método de Laemmli descrito anteriormente, tendo como parâmetros temperatura ambiente de 22 °C e corrente de 80 V por cerca de duas horas. Depois de a frente de proteínas alcançar a parte inferior do gel, a cerca de 0,5 cm da borda inferior do gel de poliacrilamida, a corrente elétrica foi desligada, as placas do minigel separadas e o gel nela contido foi retirado e corado à temperatura ambiente por cerca de duas horas utilizando uma solução aquosa de azul de Coomassie G250 própria para gel SDS-PAGE. A etapa de descoloração usou solução aquosa de metanol e ácido acético por aproximadamente 16 horas até que o gel estivesse suficientemente descolorido e em seguida estes foram mantidos em água ultrapura. Cada amostra de saliva foi submetida a três experimentos independentes de eletroforese e cada grupo foi disposto em um único gel.

As imagens dos géis foram obtidas usando um digitalizador dedicado Bio-Rad ChemiDrop MP (Bio-Rad Inc., Hercules, EUA), conectado a um computador contendo o programa Image Lab 5.2 (Bio-Rad Inc., Hercules, EUA). As linhas e bandas aqui estudadas foram selecionadas com as ferramentas contidas neste programa e as quinze bandas mais intensas foram escolhidas para a quantificação densitométrica relativa, usando valores de intensidade de cada banda ajustada pelos valores do plano de fundo. Os valores foram então analisados estatisticamente utilizando análise de variância com valor de significância p menor do que 0,05. Para essa e as demais análises estatísticas descritas no estudo, utilizou-se o programa Medcalc 16.2, (MedCalc Software bvba, Ostend, Bélgica).

4.6.2 Preparação para espectrometria de massa das proteínas salivares submetidas à eletroforese

As bandas de proteínas que mostraram diferenças estatísticas em todas as três repetições foram selecionadas para a identificação e caracterização por espectrometria de massa. As bandas de separação de cada linha, que correspondem às proteínas de cada jovem participante do estudo separadas por peso molecular, foram separadas de acordo com as imagens analisadas, utilizando-se uma lâmina de bisturi cirúrgico número 21 (Medblade Ltda., Manaus, Brasil). No caso de uma banda se localizar muito próxima da outra, essas duas foram analisadas em conjunto. Após a separação, os pedaços de gel contendo as bandas de proteínas foram colocados em tubos de microcentrifuga de 1,7 ml e recortados com uma tesoura de ponta fina em fragmentos de 1 a 2 mm. Em seguida, o corante azul de Coomassie contido no gel foi removido com a adição de uma solução contendo bicarbonato de amônio a 25 mM e acetonitrila a 50% por 30 minutos. Para o preparo do gel para digestão, este foi contraído pela adição de acetonitrila pura por 15 minutos para melhor absorção das soluções subsequentes de 12 μ L de solução de tripsina concentrada a 1 μ g/ 0.1 ml e 25 μ L de bicarbonato de amônio a 25 mM. O gel assim preparado foi mantido por 16 horas a 37 °C para o processo de digestão das proteínas. Terminado o tempo de digestão “in-gel”, 10 μ L de ácido fórmico a 1% foi adicionado e após 5 minutos toda a fase líquida foi transferida para um novo tubo. O líquido contendo as proteínas

digeridas foi submetido à secagem com evaporador rotativo e à remoção de sais com micro colunas de fase reversa (C-18 Zip-Tips®, Millipore, Billerica, EUA) para ser submetido a análise por espectrometria de massa com o mesmo equipamento e parâmetros de busca descritos nos experimentos anteriores.

Os arquivos contendo as listas de proteínas identificadas foram comparadas com a confecção de diagramas de Venn em uma ferramenta baseada em rede (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>) para identificar as proteínas em comum nas três repetições de cada banda e nas amostras de saliva de diferentes sujeitos em cada grupo. Ao final dessa análise, as proteínas em comum em todos os grupos foram identificadas inserindo as listas de cada grupo novamente nessa ferramenta. Também foi confeccionada uma lista referente a todas as proteínas submetidas à eletroforese SDS-PAGE e identificadas por espectrometria de massa.

4.7 PARTE V: COMPARAÇÃO RELATIVA DA COMPOSIÇÃO PROTEICA DOS GRUPOS CÁRIE INICIAL ATIVA E LIVRE DE CÁRIE

A parte V deste estudo seguiu os passos operatórios da parte IV, utilizando somente os grupos de lesões de cárie ativa em fase inicial (grupo MB) e sem nenhuma lesão de cárie ativa (grupo CO). Foram feitos dois géis de eletroforese SDS-PAGE, um contendo os pares de amostras de saliva de mais alta e mais baixa concentração de proteínas de cada um dos dois grupos, dispostos lado a lado no gel, e o segundo contendo os pares de amostras de saliva de concentração intermediárias, também lado a lado. A eletroforese foi realizada com 20 µg de proteínas salivares, cujas amostras foram ressuspendidas e fervidas por 5 minutos. Após o resfriamento à temperatura ambiente as proteínas ressuspendidas foram carregadas no gel de poliacrilamida a 12% (gel de separação) e 4% (gel de carregamento) e submetidas à eletroforese a 80 V por cerca de 2 horas. Após as proteínas terem alcançado o fundo do gel, a cerca de 0,5 cm da borda inferior do gel de poliacrilamida, a corrente elétrica foi interrompida e as placas de minigel foram separadas. O gel foi então submetido à coloração com solução de azul de Coomassie para SDS-PAGE por duas horas em temperatura ambiente. Na sequência, o gel foi submetido a uma solução descolorante contendo metanol, ácido acético e água na proporção de 40:10:50 até que o gel

estivesse suficientemente descolorido e mantido em água até o momento do registro de imagens.

As imagens dos géis foram obtidas usando um digitalizador dedicado Bio-Rad ChemiDrop MP (Bio-Rad Inc., Hercules, EUA), conectado a um computador contendo o programa Image Lab 5.2 (Bio-Rad Inc., Hercules, EUA). As linhas e bandas estudadas foram selecionadas com as ferramentas contidas neste programa e as quinze bandas mais intensas foram escolhidas para a quantificação densitométrica relativa, usando valores de intensidade de cada banda ajustada pelos valores do plano de fundo. Os valores foram então exportados para o programa Microsoft Excel 2013 (Microsoft Inc., Redmond, EUA), onde foram calculadas as relações MB/CO das amostras pareadas pelos valores de concentração de proteínas pela divisão do valor densitométrico da intensidade ajustada encontrado numa determinada banda na amostra do grupo MB pelo valor correspondente da amostra do grupo CO. Esses valores foram dispostos numa tabela, na qual foi feita a separação em quartis da distribuição das relações encontradas em cada par MB/CO.

Na sequência, os géis foram cortados para a separação das bandas estudadas, utilizando lâmina de bisturi número 21 (Medblade Ltda., Manaus, Brasil). No caso de uma banda se localizar muito próxima da outra, elas foram analisadas em conjunto. Como já descrito anteriormente, os géis foram submetidos à descoloração, preparados e digeridos com tripsina. O líquido contendo as proteínas digeridas foi submetido à secagem com evaporador rotativo e à remoção de sais com micro colunas de fase reversa (C-18 Zip-Tips®, Millipore, Billerica, EUA) para ser analisado por espectrometria de massa, com o mesmo equipamento e os parâmetros de análise e de identificação já descritos nos experimentos anteriores.

Os arquivos contendo as listas de proteínas identificadas foram comparadas utilizando uma ferramenta de construção de diagramas de Venn baseada em rede (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>) para identificar as proteínas em comum cada banda em todas as amostras de saliva. Os valores de ion score das proteínas encontradas em todas as bandas foram submetidos ao cálculo da relação MB/CO, da mesma maneira como foi feito com os valores densitométricos dos géis, pareando-se as amostras de acordo com a ordem dos valores de concentração de proteínas.

5 RESULTADOS

5.1 PARTE I: CARACTERIZAÇÃO DOS PARTICIPANTES DO ESTUDO E DAS AMOSTRAS UTILIZADAS

A distribuição dos participantes do estudo quanto a sexo e idade está exposta abaixo na tabela 5.1. O grupo total dos participantes apresentou em média 15,2 (desvio padrão = 1,6) anos, sendo 6 do sexo masculino e 6 do sexo feminino.

Tabela 5.1 – Distribuição por grupo da idade e sexo dos participantes do presente estudo

Grupo	Idade (anos) (Média ± desvio padrão)	Número de indivíduos por sexo (M: masculino; F: feminino)
CO (sem lesões ativas)	15,5 ± 1,8	1 M; 3 F
MB (lesões iniciais)	15,4 ± 2,0	2 M; 2 F
CA (lesões cavitadas)	14,8 ± 1,4	3 M; 1 F
p valor	0,867 *	0,368**
* calculado pelo teste de análise de variância		
** calculado pelo teste de qui-quadrado		

A distribuição das lesões cariosas de acordo com os diferentes estágios de severidade e localização está descrita na tabela 5.2. Para este estudo, foram considerados somente as lesões cavitadas ou iniciais referentes ao grupo correspondente.

Tabela 5.2 – Distribuição dos dentes lesionados de acordo com o dente acometido

Grupo	Incisivo superior	Premolar superior	Premolar inferior	Molar superior	Molar inferior
MB (lesões iniciais)	0	5	8	7	9
CA (lesões cavitadas)	2	3	1	9	6

Os dados de fluxo salivar estão representados na tabela 5.3**Erro! Fonte de referência não encontrada..** Não foi encontrada nenhuma diferença estatística entre os grupos.

Tabela 5.3 – Fluxo salivar dos jovens participantes na ocasião da coleta de saliva. Valores expressos em média (desvio padrão)

Grupo	Fluxo Salivar (ml/min)
CO (sem lesões ativas)	1,10 (0,49)
MB (lesões iniciais)	0,82 (0,18)
CA (lesões cavitadas)	1,15 (0,63)
Não foram encontradas diferenças estatisticamente entre os grupos (p=0,595)	

5.2 PARTE II: DESENVOLVIMENTO DOS PARÂMETROS DOS EXPERIMENTOS LABORATORIAIS E CARACTERIZAÇÃO INICIAL DAS AMOSTRAS COLETADAS DE SALIVA

5.2.1 Experimento 1: Concentração de proteína total

Os gráficos mostrados na figura 5.1 mostram o desenvolvimento na construção da curva de calibração dos padrões de albumina sérica bovina. Entre os experimentos A e B, os padrões foram exatamente os mesmos, julgando o baixo valor do coeficiente de determinação R^2 ter sido relativamente baixo pela variação na técnica de pipetagem. Para o experimento C foram feitos novos padrões, utilizando o mesmo lote de albumina sérica bovina. No experimento D, os padrões foram construídos a partir de outro lote de albumina sérica bovina, a mesma utilizada para o experimento final, tendo sido encontrado o valor de 0,99 para R^2 (Figura 5.1).

Figura 5.1 – Concentração de proteína total das soluções-padrão em razão da absorbância mostrando o desenvolvimento dos resultados diante os aperfeiçoamentos na construção dos padrões de albumina sérica bovina

O gráfico da figura 5.2 mostra a calibração da curva dos padrões de albumina sérica utilizadas para o cálculo das concentrações das amostras de saliva coletadas dos participantes do estudo, que estão dispostas na tabela 5.4. O valor do coeficiente de determinação R^2 encontrado foi acima de 0,99, indicando alta correlação linear dos padrões de albumina sérica. Não foi encontrada nenhuma diferença estatística entre os grupos com relação à concentração de proteínas.

Figura 5.2 – Gráfico da concentração de proteína total das soluções-padrão de albumina bovina sérica em razão da absorbância utilizadas para calcular as concentrações de proteína total das amostras de saliva utilizadas no estudo

Tabela 5.4 – Concentração de proteína total das amostras de saliva mensuradas pelo método colorimétrico de reação com ácido bicinconínico (BCA) calculadas a partir da equação mostrada na figura 5.2

Concentração de proteína total (µg/ml)	
CO (sem lesões ativas)	943,6 ± 186,4
MB (lesões iniciais)	918,9 ± 185,6
CA (lesões cavitadas)	1213,6 ± 740,1
Diferença entre os grupos não estatisticamente significativa entre os grupos (p = 0,612)	

Foi também calculado o coeficiente de correlação entre os dados de fluxo salivar e da concentração de proteínas total da saliva analisada, encontrando o valor do coeficiente de correlação de Pearson de 0,56, indicando uma correlação positiva moderada entre esses dois dados de todos os participantes do estudo.

5.2.2 Experimento 2: Determinação da quantidade de proteínas salivares para separação eletroforética

A figura 5.3 mostra o resultado do experimento-piloto para determinação da quantidade de proteínas salivares para a eletroforese SDS-PAGE. A quantidade de 20 µg apresentou o melhor equilíbrio nas imagens das bandas de alta e de baixa densidade eletroforética da mesma coluna e assim foi escolhida para a realização dos experimentos subsequentes.

Figura 5.3 – Resultado do experimento-piloto utilizando a eletroforese SDS-PAGE para determinação da quantidade de proteínas salivares. Os retângulos de linha contínua e de linha tracejada representam respectivamente as imagens das bandas de alta e de baixa densidades eletroforéticas usadas para selecionar a quantidade de proteínas salivares utilizada nos experimentos posteriores

5.2.3 Experimento 3: Determinação da composição da solução tampão de ressuspensão das amostras

A figura 5.4 mostra como a solução-tampão acrescida de DTT para ressuspender as amostras desidratadas promoveu melhor separação eletroforética em algumas bandas, quando comparadas com as amostras ressuspendidas com solução-tampão contendo BME.

Figura 5.4 – Imagem final do experimento para determinar a composição da solução tampão de ressuspensão das amostras de proteínas salivares. O retângulo destaca a melhor separação eletroforética das proteínas nas amostras com solução contendo DTT quando comparadas às amostras que continham BME

5.3 PARTE III: ANÁLISES POR ELETROFORESE COM GEL NATIVO CATIÔNICO

As imagens dos géis das amostras de saliva submetidas à eletroforese com gel nativo catiônico nas figuras 5.5 e 5.6 mostram a ausência das bandas nas alturas de separação eletroforética relativas à dos padrões de histatinas 1, 3 e 5. A análise de espectrometria de massa confirmou a ausência de histatina e de outras proteínas nas regiões de separação eletroforética correspondentes.

Figura 5.5 – Imagens representativas dos géis corados com azul-de-Coomassie relativos aos grupos lesões cavitadas de cárie (a), com lesões em fase de mancha branca (B) e o grupo sem lesões de cárie ativas (C) após as amostras de proteínas salivares serem submetidas à eletroforese com gel nativo catiônico. Em cada gel, na coluna à esquerda, estão os padrões contendo histatinas 1, 3 e 5, sendo as outras quatro colunas relativas às amostras individuais de proteínas salivares

Figura 5.6 – Imagens representativas dos mesmos géis apresentados na figura anterior, submetidos à coloração de prata posterior. Em cada gel, na coluna à esquerda estão os padrões contendo histatina 1, 3 e 5, sendo as outras colunas relativas às amostras individuais de proteínas salivares. As regiões coradas destacadas com setas próximas às bandas correspondentes à histatina-1 nos géis correspondentes aos grupos lesões cavitadas e controle nada apresentaram na identificação utilizando espectrometria de massa

5.4 PARTE IV: SEPARAÇÃO ELETROFORÉTICA POR SDS-PAGE, IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO CONTEÚDO PROTEICO DE SUAS BANDAS

As figuras 5.7 A, B e C representam a aparência dos géis SDS-PAGE após serem submetidas à eletroforese e coradas com azul-de-Coomassie, de acordo com os grupos. As quinze bandas de alto, médio e baixo peso molecular selecionadas para a quantificação estão representadas na figura 5.8. Os números correspondentes aos valores de intensidade de cada banda ajustada pelos valores do plano de fundo estão localizados no Apêndice A. As tabelas 5.5 e 5.6 mostram os valores de significância (valor de p) nas comparações em cada uma das bandas estudadas. As bandas selecionadas para identificação e caracterização de suas proteínas utilizando espectrometria de massa estão listadas na tabela 5.7. A tabela 5.8 mostra a lista das proteínas identificadas em todas as bandas do gel em pelo menos duas das amostras de cada um dos grupos, representada graficamente no diagrama de Venn da figura 5.9.

Figura 5.7 – Imagens representativas dos géis de eletroforese SDS-PAGE dos grupos com amostras de saliva de sujeitos com lesões de cárie ativa em fase avançada (A), com lesões ativas em fase inicial (B) e sem lesões de cárie ativa (C)

Figura 5.8 – Imagem representativa do gel SDS-PAGE após a realização da eletroforese mostrando as bandas estudadas. A coluna da esquerda mostra as bandas do padrão usado para referência dos pesos moleculares (Bio-Rad Precision Plus All Blue) e a coluna da esquerda mostra as bandas formadas pela separação das proteínas salivares de acordo com o respectivo peso molecular. As linhas rosas mostram os picos de cada banda, locais em que foram realizadas as medições densitométricas utilizando o programa Bio-Rad Image Lab 5.2

Tabela 5.5 – Valores de significância (valor de p) das comparações dos valores densitométricos entre os grupos de lesões iniciais de cárie e controle (sem leões ativos) em cada uma das bandas em todas as três repetições. Os valores destacados em cinza-claro realçam as bandas que mostraram valores de $p < 0,05$. As linhas coloridas em cinza escuro destacam as bandas que mostraram valores significantes em todas as três repetições, que foram selecionadas para posterior identificação do seu conteúdo proteico por espectrometria de massa

Banda	Gel 1 (MB x CO)	Gel 2 (MB x CO)	Gel 3 (MB x CO)
B1	P = 0,041	P = 0,012	P = 0,044
B2	P = 0,011	P = 0,004	P = 0,015
B3	P = 0,002	P = 0,007	P = 0,066
B4	P = 0,066	P = 0,060	P = 0,044
B5	P = 0,025	P = 0,034	P = 0,129
B6	P = 0,305	P = 0,160	P = 0,464
B7	P = 0,119	P = 0,108	P = 0,090
B8	P = 0,020	P = 0,034	P = 0,398
B9	P = 0,003	P = 0,013	P = 0,394
B10	P = 0,002	P = 0,013	P = 0,406
B11	P = 0,001	P = 0,006	P = 0,036
B12	P = 0,011	P = 0,023	P = 0,065
B13	P = 0,077	P = 0,266	P = 0,744
B14	P = 0,053	P = 0,129	P = 0,128
B15	P = 0,017	P = 0,006	P = 0,023

Tabela 5.6 – Valores de significância (valor de p) das comparações dos valores densitométricos entre os grupos de lesões cavitadas de cárie e controle (sem lesões ativas) em cada uma das bandas em todas as três repetições. As células coloridas em cinza destacam as bandas que mostraram valores de p menores que 0,05. Não houve bandas que apresentaram valores de significância menor que 0,05 em todas as três repetições

Banda	Gel 1 (CA x CO)	Gel 2 (CA x CO)	Gel 3 (CA x CO)
B1	P = 0,982	P = 0,173	P = 0,439
B2	P = 0,281	P = 0,021	P = 0,704
B3	P = 0,162	P = 0,075	P = 0,518
B4	P = 0,052	P = 0,568	P = 0,110
B5	P = 0,290	P = 0,029	P = 0,581
B6	P = 0,091	P = 0,074	P = 0,286
B7	P = 0,050	P = 0,232	P = 0,084
B8	P = 0,203	P = 0,094	P = 0,620
B9	P = 0,128	P = 0,024	P = 0,840
B10	P = 0,302	P = 0,206	P = 0,254
B11	P = 0,099	P = 0,092	P = 0,618
B12	P = 0,183	P = 0,073	P = 0,366
B13	P = 0,475	P = 0,005	P = 0,032
B14	P = 0,382	P = 0,257	P = 0,458
B15	P = 0,003	P = 0,127	P = 0,855

Tabela 5.7 - Lista de proteínas identificadas e caracterizadas por espectrometria de massa nas bandas selecionadas pela comparação densitométrica. As bandas B2, B11 e B15 foram identificadas respectivamente em conjunto com as bandas B3, B12 e B14 por estarem muito próximas uma da outra causando dificuldades em obter uma boa separação no momento da preparação do gel para análise por espectrometria de massa

Banda	Peso molecular (kDa)	Acesso	Descrição
B1	147—120	P01023	Alpha-2-macroglobulin
B2, B3	120—80	P01833	Polymeric immunoglobulin receptor
		Q6NS95	IGL@ protein
B11, B12	35,5—27,5	A0A0C4DGN4	Zymogen granule protein 16 homolog B
		P31947	14-3-3 protein sigma
		P63104	14-3-3 protein zeta/delta
		P01036	Cystatin S
B14, B15	10,4—8,1	P04080	Cystatin B
		P01040	Cystatin A
		P10599	Thioredoxin

Figura 5.9 – Diagrama de Venn mostrando o número de proteínas encontrado em todos os grupos e em cada uma das combinações no experimento para identificação das proteínas por meio da análise das bandas de gel de eletroforese SDS-PAGE por espectrometria de massa.

Tabela 5.8 - Lista das proteínas identificadas em cada um dos grupos e suas combinações utilizando separação proteica por SDS-PAGE previamente à espectrometria de massa, combinações representadas no diagrama de Venn da figura 5.9.

(Continua)

Grupos	Número	Acesso	Descrição
Proteínas encontradas em todos os grupos	43	Q9UIV8	Serpin B13
		Q9HC84	Mucin-5B
		P01034	Cystatin C
		P20061	Transcobalamin-1
		B4DJI1	L-lactate dehydrogenase
		P02768	Serum albumin
		Q0KKI6	Immunoglobulin light chain
		P62805	Histone H4
		P04745	Alpha-amylase
		Q9UGM3	Deleted in malignant brain tumors 1 protein
		P02647	Apolipoprotein A-I
		A8K2U0	Alpha-2-macroglobulin-like protein 1
		P05164	Myeloperoxidase

Tabela 5.8 - Lista das proteínas identificadas em cada um dos grupos e suas combinações utilizando separação proteica por SDS-PAGE previamente à espectrometria de massa, combinações representadas no diagrama de Venn da figura 5.9. (Continuação)

Grupos	Número	Acesso	Descrição
Proteínas encontradas em todos os grupos	43	P01036	Cystatin S
		Q08188	Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase E
		P32926	Desmoglein 3
		P26038	Moesin
		P55058	Phospholipid transfer protein
		P01833	Polymeric immunoglobulin receptor
		P25311	Zinc-alpha-2-glycoprotein
		P01871	Ig mu chain C region
		F5GXS0	Complement C4-B
		A0A0C4DGN4	Zymogen granule protein 16 homolog B
		P29508	Serpin B3
		P10599	Thioredoxin
		O43707	Alpha-actinin-4
		P31947	14-3-3 protein sigma
		P23280	Carbonic anhydrase 6
		Q9Y6R7	IgGFC-binding protein
		P01023	Alpha-2-macroglobulin
		P01591	Immunoglobulin J chain
		P06733	Alpha-enolase
		Q5U000	Cathepsin Z
		Q96DR5	BPI fold-containing family A member 2
		P63104	14-3-3 protein zeta/delta
		P52566	Rho GDP-dissociation inhibitor 2
		P04080	Cystatin B
		P00350	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating
		Q6NS95	IGL@ protein
		P13796	Plastin-2
		P07195	L-lactate dehydrogenase B chain
		P01040	Cystatin A
		P12273	Prolactin-inducible protein
Proteínas encontradas nos grupos controle (CO) e lesões iniciais (MB)	5	P30041	Peroxiredoxin-6
		Q01469	Fatty acid-binding protein, epidermal
		P99999	Cytochrome c
		Q9Y5Z4	Heme-binding protein 2
		P28325	Cystatin D

Tabela 5.8 - Lista das proteínas identificadas em cada um dos grupos e suas combinações utilizando separação proteica por SDS-PAGE previamente à espectrometria de massa, combinações representadas no diagrama de Venn da figura 5.9.

(Continuação)

Grupos	Número	Acesso	Descrição
Proteínas encontradas nos grupos controle (CO) e lesões cavitadas (CA)	5	P11021 Q8NBJ4 P14315 P01857 H3BQN4	78 kDa glucose-regulated protein Golgi membrane protein 1 Beta-actinin subunit II Ig gamma-1 chain C region Fructose-bisphosphate aldolase
Proteínas encontradas nos grupos lesões iniciais (MB) e lesões cavitadas (CA)	12	O15144 P01011 Q6P5S2 P00738 P04083 A0N5G1 P31946 P01024 P61160 P09228 P08107 P31151	Actin-related protein 2/3 complex subunit 2 Alpha-1-antichymotrypsin Protein LEG1 homolog Haptoglobin Annexin A1 Rheumatoid factor C6 light chain 14-3-3 protein beta/alpha Complement C3 Actin-related protein 2 Cystatin-AS Heat shock 70 kDa protein 1A/1B Protein S100-A7
Proteínas encontradas exclusivamente no grupo controle (sem lesões ativas)	5	P09228 F8VV32 E9PKG6 P00491 Q96HE7	Cystatin SA Lysozyme Nucleobindin-2 Purine nucleoside phosphorylase ERO1-like protein alpha
Proteínas encontradas exclusivamente no grupo lesões iniciais (MB)	16	P30838 Q02413 Q5UGI6 P27482 Q0QER2 Q9UJ70 A0A0C4DH68 P30613 P01009 P01861 C8C504 S6B2A1	Aldehyde dehydrogenase, dimeric NADP-preferring Desmoglein-1 Serine/cysteine proteinase inhibitor clade G member 1 splice variant 2 Calmodulin-like protein 3 Isocitrate dehydrogenase 1 N-acetyl-D-glucosamine kinase Protein IGKV2-24 Pyruvate kinase Alpha-1-antitrypsin Ig gamma-4 chain C region Beta-globin IgG L chain

Tabela 5.8 - Lista das proteínas identificadas em cada um dos grupos e suas combinações utilizando separação proteica por SDS-PAGE previamente à espectrometria de massa, combinações representadas no diagrama de Venn da figura 5.9.

(Conclusão)

Grupos	Número	Acesso	Descrição
Proteínas encontradas exclusivamente no grupo lesões iniciais (MB)	16	O60218	Aldo-keto reductase family 1 member B10
		Q15782	Chitinase-3-like protein 2
		P07476	Involucrin
		P06731	Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 5
Proteínas encontradas exclusivamente no grupo lesões cavitadas (CA)	13	P00558	Phosphoglycerate kinase 1
		P02743	Serum amyloid P-component
		P36952	Serpin B5
		P52565	Rho GDP-dissociation inhibitor 1
		K7EQ48	Glucose-6-phosphate isomerase
		P19652	Alpha-1-acid glycoprotein 2
		P68871	Hemoglobin subunit beta
		O75368	SH3 domain-binding glutamic acid-rich-like protein
		P01876	Ig alpha-1 chain C region
		P02042	Hemoglobin subunit delta
		P60174	Triosephosphate isomerase
		P08311	Cathepsin G
		D6CHE9	Proteinase 3

5.5 PARTE V: COMPARAÇÃO RELATIVA DA COMPOSIÇÃO PROTEICA DOS GRUPOS CÁRIE INICIAL ATIVA E NÃO-CÁRIE ATIVA

A figura 5.10, representativa das imagens dos géis de poliacrilamida (SDS-PAGE) após a eletroforese, está exposta abaixo. As bandas quantificadas para comparação dos grupos foram as mesmas quinze utilizadas no experimento anterior. Os pesos moleculares foram calculados pelo programa Bio-Rad Image Lab 5.2.

Figura 5.10 – Imagens representativas do gel SDS-PAGE após a realização de eletroforese. A coluna da esquerda (Standard) mostra as bandas da solução padrão usada para referência dos pesos moleculares (Bio-Rad Precision Plus All Blue), com os valores informados pelo fabricante. As quatro colunas da direita representam a separação das proteínas salivares de cada uma das amostras de saliva obtida pela eletroforese, neste caso sendo as maiores e as menores concentrações de proteína total dos grupos MB e CO, respectivamente, na imagem A, e das concentrações intermediárias na imagem B

Após a extração dos valores densitométricos relativos das bandas, indicados na tabela constante do Apêndice B, as relações de cada uma das bandas foram calculadas dividindo-se os valores de cada uma das quinze bandas do grupo MB pelos valores da banda correspondente do grupo CO. Os valores dessa relação MB/CO foram distribuídos em quartis, para que fosse possível observar sua distribuição. Os valores encontrados foram iguais ou maiores no grupo MB ao serem comparados ao grupo CO, como demonstrado na tabela 5.9. Na tabela 5.10 mostra as mesmas relações encontradas para cada uma das principais proteínas identificadas por espectrometria de massa encontradas em cada banda do gel que mostrou diferença na tabela anterior (Tabela 5.9).

Tabela 5.9 – Relações encontradas dividindo-se os valores densitométricos de volume das intensidades ajustado pelo valor de fundo do gel de eletroforese de cada banda do grupo MB pelo valor da banda correspondente encontrado no grupo CO, As comparações foram pareadas de acordo com a concentração de proteínas pelo método do BCA, Valores abaixo de 1 significam que os valores das bandas estudadas do grupo MB são menores quando comparadas ao grupo CO e acima de 1 significam que os valores da banda do grupo MB são maiores na mesma comparação. As cores revelam a distribuição dos valores de cada coluna em quartis: branco = 1º quartil; cinza-claro = 2º quartil; cinza-médio = 3º quartil e cinza-escuro = 4º quartil

Bandas	MB/CO alta*	MB/CO média*	MB/CO baixa*
B1	0,80	1,33	1,53
B2	1,40	1,13	1,83
B3	1,26	1,16	1,23
B4	1,21	1,28	0,95
B5	1,08	1,03	0,94
B6	1,09	1,05	0,90
B7	2,06	1,36	1,34
B8	1,12	1,18	1,12
B9	1,28	1,07	1,05
B10	1,80	1,46	1,40
B11	1,44	1,35	1,93
B12	1,56	1,27	1,89
B13	1,47	1,37	0,95
B14	1,67	1,37	0,82
B15	1,45	1,12	0,93

* Alta, média e baixa concentração de proteínas, de acordo com o experimento realizado na seção 4.4

Tabela 5.10 –1 Relações das quantidades de proteínas encontradas e quantificadas por meio da análise espectrométrica das bandas do gel de eletroforese SDS-PAGE, dividindo-se o escore de íon correspondente a cada proteína do grupo Mancha branca (MB) pelo escore da mesma proteína encontrada no grupo controle (CO). As comparações foram pareadas de acordo com a concentração de proteínas pelo método do BCA. Valores abaixo de 1 significam que os valores das bandas estudadas do grupo MB são menores quando comparadas ao grupo CO e acima de 1 significam que os valores da banda do grupo MB são maiores na mesma comparação. As cores revelam a distribuição dos valores de cada coluna em quartis: branco = 1º quartil; cinza-claro = 2º quartil; cinza-médio = 3º quartil e cinza-escuro = 4º quartil

Banda	Peso molecular (kDa)	Acesso	Descrição	MB/CO Alta *	MB/CO Média *	MB/CO Baixa *
B1	147 a 120	P01023	Alpha-2-macroglobulin	1,94	2,64	2,32
B2, B3, B4	120 a 80	P01833	Polymeric immunoglobulin receptor	1,72	1,01	4,66
B7, B8	62,2 a 46,6	P04745	Alpha-amylase 1	1,00	1,46	1,56
		Q9UIV8	Serpin B13	1,11	1,31	2,89
		P23280	Carbonic anhydrase 6	1,15	0,53	0,62
		P25311	Zinc-alpha-2-glycoprotein	1,63	1,11	2,26
		F6KPG5	Albumin (Fragment)	1,52	1,50	2,02
		P29508	Serpin B3	0,33	0,64	7,57
B9, B10	46,6 a 42,8	P04745	Alpha-amylase 1	1,06	0,99	0,83
		P25311	Zinc-alpha-2-glycoprotein	1,31	0,95	1,83
		Q96DR5	BPI fold-containing family A member 2	1,00	0,42	0,53
B11, B12	35,5 a 27,5	Q6NS95	IGL@ protein	1,62	1,27	2,44
B13	27,5 a 10,5	P31025	Lipocalin-1	4,57	2,00	1,76
		A0A0C4DGN4	Zymogen granule protein 16 homolog B	2,74	0,56	2,34
		P80188	Neutrophil gelatinase-associated lipocalin	4,26	1,51	1,48
		P12273	Prolactin-inducible protein	2,96	2,32	4,81
B14, B15	10,4 a 8,1	P01036	Cystatin S	8,97	2,00	1,18
		P04080	Cystatin B	0,62	0,59	2,68

* Alta, média e baixa concentração de proteínas, de acordo com o experimento realizado na seção 4.4

6 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos nos experimentos deste estudo mostram que existe uma tendência a composição proteica salivar de sujeitos acometidos pela cárie dentária é diferente da de sujeitos livres dessa doença. Para chegarmos a esses resultados, primeiramente houve a necessidade de se ajustar os parâmetros das análises com o material que fora coletado.

A parte do estudo em que foram feitos os experimentos para determinar quais parâmetros seriam utilizados posteriormente, especialmente os de eletroforese, de modo a trazer resultados que possibilitassem uma melhor análise para identificar das proteínas do gel. Porém, as dificuldades encontradas se relacionaram com os materiais do experimento da reação do BCA para determinar a concentração de proteína total. Para uma quantificação mais confiável, o valor do coeficiente de determinação R^2 deve ser o mais próximo possível de 1, já que esse valor é definido como uma medida de ajustamento dos pontos a uma função linear, representado por uma reta relacionando a absorbância medida com a concentração calculada (Walker, 2007). Nestes experimentos, adotamos como critério considerar somente valores acima de 0,99, para contemplar fatores passíveis de acontecer, como a própria variação dos valores mensurados pelo equipamento, além do protocolo contemplar a realização das medições em duplicata e considerar a média dessas duas medidas, diminuindo desta forma as variações inerentes da análise.

Com relação ao desenvolvimento dos parâmetros da eletroforese em gel de poliacrilamida adicionada de dodecil-sulfato de sódio (SDS-PAGE), sabe-se que a adição de substâncias como ditioneítrito (DTT) ou β -mercaptoetanol (BME) à solução-tampão para ressuspender a amostra aumenta a resolução da imagem do gel resultante da eletroforese (Walker, 2007). Isso se deve a capacidade desses compostos de romper as ligações dissulfeto, que se relacionam com a estabilidade tridimensional das moléculas proteicas (Voet; Voet, 2010). Há diferença no desempenho das duas substâncias nas condições em que foram utilizadas, pois o DTT possui melhor capacidade de resolução na separação das proteínas pela eletroforese em condições utilizadas quando comparado ao BME, como é possível comprovar na imagem resultante do gel. Também é de importância definir a quantidade de proteínas a serem analisadas por vez para que o equilíbrio seja

alcançado. Uma quantidade maior de proteínas que a ideal pode fazer com que uma banda proteica se confunda com a precedente, uma com menor quantidade de proteínas pode conter bandas de interesse que não sejam detectadas nas análises densitométricas do gel de eletroforese. Desta forma, a quantidade de 20 µg, utilizando solução tampão contendo DTT como agente redutor foi a combinação escolhida para as análises por apresentar o equilíbrio citado com a melhor separação proteica nas imagens eletroforéticas.

Ao serem realizadas as análises preliminares, os resultados encontrados não revelaram diferenças significativas entre os grupos. Os dados de fluxo salivar encontrados no nosso estudo estão de acordo com outros estudos publicados que reportaram o uso de estimulação mecânica salivar (Söderling et al., 1993; Dawes, 2008). O mesmo ocorreu quando se compararam os dados de concentração de proteínas entre o nosso estudo e outros que relacionaram a presença de lesões de cárie com a concentração de proteínas salivares (Banderas-Tarabay et al., 2002; Roa et al., 2008; Vibhakar et al., 2013), o que pode comprovar a similaridade de condições em que os estudos foram realizados. Da mesma forma, os resultados da eletroforese em gel catiônico realizada na terceira parte da tese foram bastante semelhantes com os encontrados nas publicações estudadas (Oppenheim et al., 1988; Siqueira et al., 2010), nas quais as histatinas teriam sido degradadas no ambiente oral, não sendo possível identificar essas proteínas intactas nas amostras de saliva submetidas ao gel de eletroforese nativo catiônico e na posterior identificação e caracterização por espectrometria de massa.

Uma abordagem técnica de utilização de técnicas espectrométricas, conhecida como one-shot, possui a vantagem de ser operacionalmente simples e consegue gerar uma quantidade grande de dados. Ela consiste em submeter diretamente a amostra de saliva ao espectrômetro, ou seja, a utilização de somente uma técnica para analisar o conteúdo proteômico salivar. Porém, nela o resultado é mascarado pela presença de muitas proteínas, condição essa que pode fazer com que os elementos de maior concentração mascarem a identificação dos elementos menos abundantes. Da mesma forma, a utilização somente de técnicas eletroforéticas acarreta na separação das proteínas da solução somente por uma característica de suas moléculas, como o peso molecular no caso da SDS-PAGE ou por fatores como por exemplo as cargas moleculares das proteínas no caso dos métodos nativos

(Walker, 2007). Uma abordagem utilizada para superar essa dificuldade é o uso de técnicas bidimensionais ou 2D. Essa abordagem consiste em uma associação de duas técnicas, utilizando uma característica da molécula para fracionar as amostras com o objetivo de melhorar o desempenho da segunda análise (Castagnola et al., 2012). No nosso caso, optamos por adotar uma abordagem bidimensional associando o uso de eletroforese SDS-PAGE para separar as proteínas pelo peso molecular na primeira dimensão com a espectrometria de massa na segunda pela maior facilidade da técnica e pelos bons resultados apresentados. A lista constante da tabela 5.8 e o seu diagrama de Venn correspondente na figura 5.9 podem comprovar isso, já que a lista de proteínas apresenta uma boa consistência, com um grande número de proteínas em comum nos três grupos e ao mesmo tempo apresenta algumas proteínas exclusivas em certas combinações de dois grupos e os grupos individualmente. Essa separação prévia por peso molecular feita com o SDS-PAGE promove uma identificação mais precisa dos seus componentes, pois o que está sendo analisado é mistura contendo menor número total de proteínas, melhorando assim o rendimento do equipamento espectrométrico. Porém há uma necessidade de se estudar a utilização de novas técnicas e novos equipamentos, que melhorem a qualidade das análises proteômicas e que permitam uma quantificação mais precisa, possibilitando a busca de marcadores salivares para os diferentes estágios de severidade da doença cárie.

A separação eletroforética encontrada nos experimentos de SDS-PAGE realizados no presente estudo foi semelhante à de outros estudos com eletroforese, nos quais bandas de alto e de baixo peso molecular mostraram diferenças entre os grupos cárie e não cárie (Banderas-Tarabay et al., 2002; Roa et al., 2008). Porém, a separação promovida por SDS-PAGE contempla somente os pesos moleculares das proteínas e não outros fatores. Pelo nosso conhecimento, o presente estudo foi o primeiro a caracterizar com espectrometria de massa as proteínas que fazem parte de cada uma dessas bandas que apresentaram diferenças na comparação da saliva de sujeitos com lesões cariosas em diferentes fases de severidade da doença e sujeitos livres de cárie. Essa associação foi capaz de identificar e caracterizar diferentes proteínas que fazem parte de cada uma das bandas que apresentaram diferenças densitométricas entre as amostras.

Uma característica encontrada nos métodos proteômicos baseados em espectrometria de massas é a possibilidade de haver pequenas variações nos resultados das análises. Essas variações tendem sempre a ser maiores que as observadas em métodos clássicos de quantificação de proteínas, como por exemplo métodos colorimétricos, e pode ser devida à natureza física utilizada pelos principais espectrômetros de massa para a aquisição de dados. Por esse motivo, as análises realizadas contemplaram na sua metodologia um número de repetições para que se pudessem diferenciar as possíveis variações metodológicas das diferenças reais que foram encontradas nos grupos. Na parte IV, mais especificamente na tabela 5.5, essas variações estão perceptíveis, evidenciando que existiram outras seis bandas nas quais houve resultados densitométricos bastante parecidos em dois dos três géis no que diz respeito à diferença entre os grupos MB e CO. O fato de as proteínas dos géis terem tido um comportamento semelhante em todos os experimentos com eletroforese SDS-PAGE, em que todas as bandas eletroforéticas foram mais intensas nos grupos com lesões cariosas ativas quando comparadas ao grupo sem lesões ativas sustenta a consistência na repetição dos experimentos, incluindo o experimento da parte V. Porém, nesse caso, os valores das bandas não foram estatisticamente diferentes em todas as repetições.

Na comparação das análises densitométricas dos grupos CA e MB, uma vez que houve diferença entre a intensidade das bandas relativas ao grupo CO, podemos inferir que as bandas do grupo MB estão mais intensas do que do grupo CA. Levando em consideração as diferenças individuais, que em um estudo com amostra pequena são mais realçadas, podemos entender que as proteínas estão mais abundantes nessas áreas no grupo de lesões iniciais do que em lesões cavitadas. Como o objetivo deste estudo foi o de verificar e caracterizar diferenças, faz sentido escolher os grupos cujos dados estavam em extremos opostos para que as diferenças fossem realçadas e identificadas. Desta forma, as análises mais aprofundadas de quantificação contemplaram os grupos MB e CO, diferentemente do que a escolha ditada somente por critérios clínicos poderia se fazer supor.

Uma hipótese para a ocorrência dessa diferença do proteoma da saliva de sujeitos com lesões iniciais e com lesões cavitadas é de que a dinâmica do processo de doença e do acúmulo de microrganismos é diferente nas duas situações. Lesões mais profundas, como as lesões cavitadas já expondo a dentina (escores 5 e 6 do

ICDAS), podem fornecer condições para que as bactérias se acumulem de maneira e proporção diferentes das lesões mais iniciais (Thomas et al., 2008). Este acúmulo das diferentes espécies em diferentes proporções pode promover a ativação da resposta imunológica do hospedeiro de maneiras distintas. A caracterização das proteínas dessas bandas nos deu mais subsídios para essa hipótese, já que elas estão relacionadas com resposta inflamatória (macroglobulinas e imunoglobulinas), atividade antimicrobiana (cistatinas) e metabólicas (proteína 14-3-3 e tioredoxina). Uma delas não possui a função caracterizada, porém está descrita como proteína homóloga dos grânulos de zimogênio, que se relaciona com função secretora exócrina, mas que também possui a capacidade de se ligar a certas espécies de bactérias (Heo et al., 2013).

Já o aumento da macroglobulina, imunoglobulina, proteína homóloga dos grânulos de zimogênio e cistatinas encontrada na saliva de sujeitos com lesões ativas de cárie em fase inicial pode ser possivelmente explicado pela maturação do biofilme após acumular por um longo período de tempo sobre a superfície dental e essa placa madura promover o aparecimento das lesões cariosas com a repetição dos episódios de acidificação do meio no entorno de dente (Takahashi; Nyvad, 2008). Essa maturação ou alteração desse meio poderia promover o estímulo para o aumento dessas proteínas antimicrobianas e relacionadas à atividade metabólica. A atividade das proteínas 14-3-3 e da tioredoxina são relacionadas à interação e regulação das atividades de outras proteínas e de processos celulares como sinalização, divisão e apoptose, além de poderem ser relacionadas à resposta inflamatória (Van Hemert et al., 2001; Collet; Messens, 2010), podendo estar assim indiretamente relacionadas à resposta inflamatória estimulada pelo acúmulo do biofilme cariogênico na cavidade oral. Outro estudo que comparou a presença de cárie em lesões cavitadas e pacientes sem lesões de cárie (Vitorino et al., 2006) também mostrou diferenças na quantidade de imunoglobulinas, sendo que da mesma forma estiveram em maior quantidade na saliva de pacientes com lesões de cárie. Porém, no nosso estudo, as cistatinas encontradas nos pacientes livres de cárie estão diminuídas, ao contrário dos resultados encontrados naquele, podendo essa diferença ser atribuída à diferença das concentrações relacionadas aos diferentes estágios das lesões de cárie.

Outro artigo reportou a presença de proteínas de 17 kDa (baixo peso molecular) detectadas em maior quantidade em homens adultos com lesões de cárie cavitadas

quando comparadas a homens sem lesões de cárie (Roa et al., 2008). Acreditamos que as cistatinas e tioredoxina encontradas no nosso estudo podem ser listadas nessa área, considerando-se que a separação eletroforética nessa região dada pela concentração de poliacrilamida de 10% utilizada no gel pelos autores não ser a ideal para a separação eletroforética na região de baixo peso molecular. A concentração de poliacrilamida utilizada nesse estudo foi ainda menor que a utilizada nos experimentos do presente estudo (12%), fato que melhora a resolução na separação eletroforética das proteínas de alto peso molecular (especialmente entre 100 a 200 kDa) e desfavorece a resolução nessa região das proteínas de baixo peso molecular. Para se contornar o problema de a concentração do gel favorecer a separação proteica eletroforética na região de alto peso molecular e desfavorecer na região de baixo peso molecular (ou ao contrário), pode-se realizar o experimento com dois géis em duas concentrações diferentes de poliacrilamida (Walker, 2007). Outra alternativa, que foi a abordagem por nós utilizada no presente estudo, é a de associar a eletroforese numa concentração intermediária de poliacrilamida com a caracterização utilizando métodos estado-da-arte, como por exemplo a espectrometria de massa (Aebersold; Goodlett, 2001; Shevchenko et al., 2007).

O estudo quantitativo da comparação relativa das bandas de separação eletroforéticas e das proteínas identificadas teve como objetivo observar as relações de aumento das bandas e proteínas do grupo MB quando comparadas ao grupo CO, representados pelos valores constantes das tabelas 5.9 e 5.10. As bandas B5 e B6, que correspondem ao peso molecular da alfa-amilase, se mostram sem modificação nesses dois grupos e não foram levadas à identificação das proteínas e à quantificação com espectrômetro de massa, diferentemente de outro que encontrou diferenças na quantidade dessa proteína em sujeitos que apresentavam lesões cavitadas (Vitorino et al., 2006). Na maioria das outras bandas, foi observada mudança maior que 10% nos valores densitométricos do gel eletroforético, que se mostra relevante dadas as limitações de um método de análise de imagens numa metodologia que no geral apresentou alta variabilidade. Por essa razão decidimos realizar a análise dividindo a distribuição dos valores de relação densitométrica MB/CO em quartis. Na tabela 5.9, que lista as bandas eletroforéticas, comparando os valores encontrados nas bandas horizontalmente, ou seja, os valores encontrados nas bandas com os diferentes pares comparativos, observa-se uma correspondência na

maior parte das bandas estudadas. Exceção foi encontrada nas bandas B1, B14 e B15, que correspondem às bandas que contém macroglobulina e cistatinas, proteínas associadas à defesa imune e à atividade antimicrobiana, respectivamente. A banda B1 apresentou maior relação dos valores densitométricos nas amostras de saliva com baixa concentração de proteínas e o inverso nas de alta, inclusive o valor encontrado foi menor que zero, indicando que essa banda teve menor concentração densitométrica de proteínas no grupo que apresentava lesões de cárie quando comparado ao grupo sadio. As bandas B14 e B15 apresentaram números opostos, sendo que as amostras de alta concentração de proteínas apresentaram os valores dessa relação muito maiores que as de baixa concentração. Ainda na análise horizontal dessa tabela, de uma forma geral os valores de concentração de proteínas intermediários apresentaram relação intermediária de valores densitométricos quando comparados aos de alta e de baixa concentração. Na análise vertical dessa tabela, pode se verificar que as relações dos valores densitométricos dos dois grupos estão parecidas entre si. Com exceção feita às bandas mencionadas, há uma correspondência das distribuições dos valores em quartis ou dos valores propriamente ditos pelas bandas de alto, médio e baixo peso molecular. Numa análise visual dos dados, a localização dos tons de cinza das linhas nessa tabela é parecida nas diferentes colunas, e quando não foi encontrada essa correspondência de cores nas linhas, os valores numéricos são parecidos.

Comparando-se a tabela 5.9 com a tabela 5.10, podemos verificar que as proteínas encontradas nas bandas eletroforéticas seguem um padrão parecido nas duas tabelas, porém há de se considerar que uma banda eletroforética é composta por várias proteínas de peso molecular parecido. Por isso não é de se surpreender que existam proteínas que se encontram em menor quantidade no grupo com lesões iniciais quando comparado com o grupo controle. As proteínas estudadas nesse experimento foram encontradas em uma determinada banda de separação eletroforética de todas as amostras. Em alguns casos, o valor do ion score foi baixo o suficiente para fazer com que qualquer variação pudesse representar um fator grande. Por isso é possível notar a presença de números relativamente altos nessas relações de ion score entre os grupos MB e CO, quando comparados aos valores da tabela anterior. De uma forma geral, as análises horizontais e verticais dos valores da tabela 5.9 podem ser aplicadas na tabela 5.10, ou seja, os tons de cinza têm correspondência

nas linhas de alto, médio e baixo peso molecular das diferentes concentrações de proteínas. Também, quando não há correspondência das distribuições dos quartis, os valores numéricos estão próximos. Exceções foram encontradas com o receptor polimérico de imunoglobulina das bandas B2 a B4, serpina B3 e B13 das bandas B7 e B8, proteínas dos grânulos de zimogênio da banda B13 e cistatinas S e B das bandas B14 e B15, que são proteínas que podem estar relacionadas à resposta imune e atividade antimicrobiana. Isso poderia guiar novas investigações a respeito de uma possível correlação entre a concentração de proteínas total e a quantificação de cada uma dessas proteínas.

Uma limitação do presente estudo é o tamanho amostral dos grupos estudados. Estudos com maior número de participantes aumentam o poder de demonstrar diferenças estatísticas, porém este estudo teve como objetivo provar que existiam diferenças na composição salivar entre pacientes sadios e em diferentes estágios da doença cárie, especialmente na fase inicial. Outros fatores influenciaram na seleção de uma amostra pequena por grupo, um dos mais importantes nesse aspecto foi a realização da eletroforese em igualdade de situação. Para um experimento eletroforético ter a capacidade de realizar comparações quantitativas, a maior igualdade de condições de condições deve ser conseguida, o que não é possível se a separação eletroforética for realizada em géis diferentes, pois pode haver diferença nas condições de polimerização da poliacrilamida do gel. Um cuidado que tivemos na montagem dos sistemas foi a montagem dos sistemas eletroforéticos de SDS-PAGE deixando um espaço de um poço entre uma amostra ressuspensa de proteínas salivares e outra para evitar uma possível contaminação cruzada das bandas de maior concentração com a banda correspondente de outra amostra, evitando assim problemas posteriores em passos como a quantificação densitométrica ou o próprio preparo do gel para análise em espectrometria de massa. Para estudos mais aprofundados, especialmente nos que objetivarem estabelecer uma diferenciação quantitativa de determinadas proteínas ou grupos proteicos, a seleção de uma amostra populacional maior por grupo se torna necessária, preferencialmente utilizando métodos de análise proteômica que não apresentem as limitações da eletroforese em gel.

O presente estudo, utilizando de diferentes metodologias, mostrou que existem diferenças na composição proteômica salivar de sujeitos acometidos de cárie em

diferentes estágios e que essas diferenças estiveram mais realçadas nos sujeitos acometidos de cárie em fase inicial do que aqueles acometidos em lesões em fase mais avançada. Certas proteínas se mostraram em maior quantidade nesses participantes quando comparadas às de sujeitos livres de lesões de cárie ativa, corroborando com os resultados encontrados em outros estudos (Banderas-Tarabay et al., 2002; Vitorino et al., 2006; Roa et al., 2008). Futuros estudos são necessários para melhor determinar a quantidade relativa das proteínas relacionadas neste estudo, utilizando grupos de maior tamanho amostral incluindo participantes acometidos de lesões de cárie em fases iniciais e técnicas label-free mais avançadas de análise proteômica qualitativa (para identificação e caracterização das proteínas) e quantitativas, incluindo outras análises utilizando espectrometria de massa.

7 CONCLUSÕES

A combinação de métodos de análise proteômica clássicos como SDS-PAGE e modernos como a espectrometria de massa permitiu uma abordagem proteômica mais completa, capaz de ressaltar as diferenças encontradas no proteoma salivar de adolescentes com lesões ativas de cárie em diferentes estágios quando comparado com o de adolescentes sem lesões cáries ativas. Adolescentes com lesões de cárie ativa em estágios iniciais (lesões não cavitadas) possuem diferenças quantitativas em algumas de suas bandas eletroforéticas quando comparadas as de sujeitos livres de lesões de cárie ativa. Essa diferença, ao contrário, não foi observada com relação aos participantes que apresentavam lesões de cárie em estágios avançados (lesões cavitadas).

Parâmetros para a eletroforese SDS-PAGE com proteínas salivares ótimos determinados neste estudo incluem a ressuspensão das alíquotas de proteínas desidratadas utilizando solução-tampão adicionada de ditioneitol (DTT) a 5 mM e a realização dos experimentos de eletroforese com uma quantidade de 20 µg de proteínas salivares por amostra, para melhorar a separação e facilitar a detecção e a quantificação das bandas de alta e baixa densidade eletroforética.

Foram observadas diferenças na quantidade de proteínas encontradas na saliva dos adolescentes que possuem lesões de cárie ativas em fase inicial quando comparadas com aqueles que não apresentavam lesões de cárie ativas, por meio da análise densitométrica das bandas de alto, médio e baixo pesos moleculares do gel de eletroforese SDS-PAGE e por escores de espectrometria de massa das proteínas nelas encontradas.

REFERÊNCIAS¹

Aebersold R, Goodlett DR. Mass spectrometry in proteomics. *Chem Rev.* 2001;101(2):269-96.

Aebersold R, Mann M. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature.* 2003 Mar;422(6928):198-207.

Affoo RH, Foley N, Garrick R, Siqueira WL, Martin RE. Meta-analysis of salivary flow rates in young and older adults. *J Am Geriatr Soc.* 2015 Oct;63(10):2142-51. doi: 10.1111/jgs.13652.

Amerongen AVN, Veerman ECI. Saliva – the defender of the oral cavity. *Oral Dis.* 2002 Jan;8(1):12-22.

Baelum V, Van Palenstein Helderman W, Hugoson A, Yee R, Fejerskov O. O papel da odontologia no controle global da cárie e doença periodontal. In: Fejerskov O, Kidd EAM. *Cárie dentária: a doença e seu tratamento clínico.* 2ª ed. São Paulo: Editora Santos; 2011. p. 575-605.

Bailey U-M, Punyadeera C, Cooper-White JJ, Schulz BL. Analysis of the extreme diversity of salivary alpha-amylase isoforms generated by physiological proteolysis using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2012 Dec;911:21-6. doi: 10.1016/j.jchromb.2012.10.023.

Banderas-Tarabay JA, Zacarías-D'Oleire IG, Garduño-Estrada R, Aceves-Luna E, González-Begné M, Zacarías-D'Oleire IG, et al. Electrophoretic analysis of whole saliva and prevalence of dental caries. A study in Mexican dental students. *Arch Med Res.* 2002 Sep-Oct;33(5):499-505.

Bank RA, Hettema EH, Arwert F, Amerongen AV, Pronk JC. Electrophoretic characterization of posttranslational modifications of human parotid salivary alpha-amylase. *Electrophoresis.* 1991 Jan;12(1):74-9.

Bardow A, Lagerlöf F, Nauntofte B, Tenovuo J. O Papel da Saliva. In: Fejerskov O, Kidd EAM. *Cárie dentária: a doença e seu tratamento clínico.* 2ª ed. São Paulo: Editora Santos; 2011. p. 190-207.

¹ De acordo com Estilo Vancouver.

Baron AC, DeCarlo AA, Featherstone JDB. Functional aspects of the human salivary cystatins in the oral environment. *Oral Dis.* 1999 Jul;5(3):234-40.

Baum BJ, Bird JL, Longton RW. Polyacrylamide gel electrophoresis of human salivary histidine-rich-polypeptides. *J Dent Res.* 1977 Sep;56(9):1115-8.

Benzian H, Monse B, Heinrich-Weltzien R, Hobdell M, Mulder J, van Palenstein Helderman W. Untreated severe dental decay: a neglected determinant of low Body Mass Index in 12-year-old Filipino children. *BMC Public Health.* 2011;11:558. doi: 10.1186/1471-2458-11-558.

Beranova-Giorgianni S. Proteome analysis by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry: strengths and limitations. *TrAC.* 2003 May;22(5):273-81.

Biazevic MGH, Rissotto RR, Michel-Crosato E, Mendes LA, Mendes MOA. Relationship between oral health and its impact on quality of life among adolescents. *Braz Oral Res.* 2008 Jan-Mar;22(1):36-42.

Bolton RW, Hlava GL. Evaluation of salivary iga antibodies to cariogenic microorganisms in children. Correlation with dental caries activity. *J Dent Res.* 1982 Nov;61(11):1225-8.

Braga MM, Mendes FM, Ekstrand KR. Detection activity assessment and diagnosis of dental caries lesions. *Dent Clin North America.* 2010 Jul;54(3):479-93. doi: 10.1016/j.cden.2010.03.006.

Brandtzaeg PER. Do salivary antibodies reliably reflect both mucosal and systemic immunity? *Ann N Y Acad Sci.* 2007 Mar;1098(1):288-311.

Bratthall D, Serinirach R, Hamberg K, Widerström L. Immunoglobulin A reaction to oral streptococci in saliva of subjects with different combinations of caries and levels of mutans streptococci. *Oral Microbiol Immunol.* 1997 Aug;12(4):212-8.

Castagnola M, Cabras T, Iavarone F, Fanali C, Nemolato S, Peluso G, et al. The human salivary proteome: a critical overview of the results obtained by different proteomic platforms. *Expert Rev Proteomics.* 2012;9(1):33-46. doi: 10.1586/epr.11.77.

Chaudhuri B, Rojek J, Vickerman MM, Tanzer JM, Scannapieco FA. Interaction of Salivary alpha-Amylase and Amylase-Binding-Protein A (AbpA) of *Streptococcus gordonii* with Glucosyltransferase of *S. gordonii* and *Streptococcus mutans*. *BMC Microbiol.* 2007 Jun;7(1):1-9.

Choi S, Baik JE, Jeon JH, Cho K, Seo D-G, Kum K-Y, et al. Identification of *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide-binding proteins in human saliva. *Mol Immunol.* 2011 Sep;48(15–16):2207-13. doi: 10.1016/j.molimm.2011.06.434.

Collet JF, Messens J. Structure, function, and mechanism of thioredoxin proteins. *Antioxid Redox Signal.* 2010 Oct;13(8):1205-16. doi: 10.1089/ars.2010.3114.

Cury JA, Tenuta LM. Enamel remineralization: controlling the caries disease or treating early caries lesions? *Braz Oral Res.* 2009;23(Suppl 1):23-30.

Davies HS, Pudney PDA, Georgiades P, Waigh TA, Hodson NW, Ridley CE, et al. Reorganisation of the Salivary Mucin Network by Dietary Components: Insights from Green Tea Polyphenols. *PLoS ONE.* 2014;9(9):e108372. doi:10.1371/journal.pone.0108372.

Dawes C. Circadian rhythms in human salivary flow rate and composition. *The J Physiol.* 1972 Feb;220(3):529-45.

Dawes C. The effects of flow rate and duration of stimulation on the concentrations of protein and the main electrolytes in human parotid saliva. *Arch Oral Biol.* 1969 Mar;14(3):277-94.

Dawes C. Salivary flow patterns and the health of hard and soft oral tissues. *J Am Dent Assoc.* 2008 May;139 Suppl:18s-24s.

Dawes C. Stimulus effects on protein and electrolyte concentrations in parotid saliva. *J Physiol.* 1984 Jan;346:579-88.

de Hoffmann E, Stroobant V. Mass spectrometry: principles and applications. 3^a ed. Hoboken: John Wiley & Sons; 2007.

DeSouza LV, Siu KWM. Mass spectrometry-based quantification. *Clin Biochem.* 2013 Apr;46(6):421-31. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2012.10.025.

Driscoll J, Zuo Y, Xu T, Choi JR, Troxler RF, Oppenheim FG. Functional comparison of native and recombinant human salivary histatin 1. *J Dent Res*. 1995 Dec;74(12):1837-44.

Duckworth RM, Jones S. On the relationship between the rate of salivary flow and salivary fluoride clearance. *Caries Res*. 2015;49(2):141-6. doi: 10.1159/000365949.

Eng JK, McCormack AL, Yates JR. An approach to correlate tandem mass spectral data of peptides with amino acid sequences in a protein database. *J Am Soc Mass Spectrom*. 1994;5(11):976-89. doi: 10.1016/1044-0305(94)80016-2.

Fábián TK, Hermann P, Beck A, Fejérdy P, Fábián G. Salivary defense proteins: Their network and role in innate and acquired oral immunity. *Int J Mol Sci*. 2012;13(4):4295-320. doi: 10.3390/ijms13044295.

Ferguson DB, Fort A. Circadian variations in human resting submandibular saliva flow rate and composition. *Arch Oral Biol*. 1974;19(1):47-55.

Gibbons RJ, Hay DI. Human salivary acidic proline-rich proteins and statherin promote the attachment of *Actinomyces viscosus* LY7 to apatitic surfaces. *Infect Immun*. 1988 Feb;56(2):439-45.

Gomez J. Detection and diagnosis of the early caries lesion. *BMC Oral Health*. 2015;15(Suppl 1):S3. doi: 10.1186/1472-6831-15-S1-S3.

Helmerhorst EJ, Alagil AS, Siqueira WL, Oppenheim FG. Oral fluid proteolytic effects on histatin 5 structure and function. *Arch Oral Biol*. 2006;51(12):1061-70.

Helmerhorst EJ, Oppenheim FG. Saliva: a dynamic proteome. *J Dent Res*. 2007 Aug;86(8):680-93.

Helmerhorst EJ, Traboulsi G, Salih E, Oppenheim FG. Mass spectrometric identification of key proteolytic cleavage sites in statherin affecting mineral homeostasis and bacterial binding domains. *J Proteome Res*. 2010 Oct;9(10):5413-21. doi: 10.1021/pr100653r.

Henskens YMC, van der Velden U, Veerman ECI, Amerongen AVN. Protein, albumin and cystatin concentrations in saliva of healthy subjects and of patients with gingivitis periodontitis. *J Periodont Res*. 1993 Jan;28(1):43-8.

Heo S-M, Choi K-S, Kazim LA, Reddy MS, Haase EM, Scannapieco FA, et al. Host defense proteins derived from human saliva bind to *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun*. 2013 Apr;81(4):1364-73. doi: 10.1128/IAI.00825-12.

Hirtz C, Chevalier F, Centeno D, Rofidal V, Egea J-C, Rossignol M, et al. MS characterization of multiple forms of alpha-amylase in human saliva. *Proteomics*. 2005 Nov;5(17):4597-607.

Hirtz C, Chevalier F, Sommerer N, Raingeard I, Bringer J, Rossignol M, et al. Salivary protein profiling in type I diabetes using two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry. *Clin Proteomics*. 2006;2(1):117-27.

Hjemeel LM, Chrambach A. Electrophoresis and electrofocusing in detergent containing media: A discussion of basic concepts. *Electrophoresis*. 1981 Feb;2(1):1-11.

Humphrey SP, Williamson RT. A review of saliva: Normal composition, flow, and function. *J Prosthet Dent*. 2001 Feb;85(2):162-9.

Huq NL. A review of the salivary proteome and peptidome and saliva-derived peptide therapeutics. *Int J Pept Res Ther*. 2007 Sep;13(4):547-64. doi: 10.1007/s10989-007-9109-9.

Isemura S, Saitoh E, Ito S, Isemura M, Sanada K. Cystatin S: a cysteine proteinase inhibitor of human saliva. *J Biochem*. 1984 Oct;96(4):1311-4.

Ismail AI. Visual and visuo-tactile detection of dental caries. *J Dent Res*. 2004;83(supp 1):C56-C66.

Ismail AI, Sohn W, Tellez M, Amaya a, Sen a, Hasson H, et al. The International Caries Detection and Assessment System (ICDAS): an integrated system for measuring dental caries: Methods. *Community Dent Oral Epidemiol*. 2007 Apr;35(3):170-8.

Johnsson M, Levine MJ, Nancollas GH. Hydroxyapatite binding domains in salivary proteins. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1993;4(3):371-8.

Kavanagh K, Dowd S. Histatins: antimicrobial peptides with therapeutic potential. *J Pharm Pharmacol*. 2004 Mar;56(3):285-9.

Koga-Ito CY, Martins CAdP, Balducci I, Jorge AOC. Correlation among mutans streptococci counts, dental caries, and IgA to *Streptococcus mutans* in saliva. *Braz Oral Res.* 2004 Oct-Dec;18(4):350-5.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970 Aug;227(5259):680-5.

Lagerlof F, Oliveby A. Caries-protective factors in saliva. *Adv Dent Res.* 1994 Jul;8(2):229-38.

Lagerlof F, Oliveby A, Ekstrand J. Physiological factors influencing salivary clearance of sugar and fluoride. *J Dent Res.* 1987 Feb;66(2):430-5.

Lamy E, Costa AR, Antunes CIM, Vitorino R, Amado F. Protein electrophoresis in saliva study. In: Ghowsi K. *Electrophoresis*. Rijeka: InTech; 2012. doi: 10.5772/48586.

Lee YH, Zimmerman JN, Custodio W, Xiao Y, Basiri T, Hatibovic-Kofman S, et al. Proteomic evaluation of acquired enamel pellicle during in vivo formation. *PLoS ONE.* 2013;8(7):e67919. doi:10.1371/journal.pone.0067919.

Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM. *Lehninger princípios de bioquímica*. São Paulo: Artmed; 2011.

Levine M. Susceptibility to dental caries and the salivary proline-rich proteins. *Int J Dent.* 2011;2011: 953412. doi: 10.1155/2011/953412.

Levine MJ. Development of artificial salivas. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1993;4(3-4):279-86.

Lovrien R, Matulis D. Assays for total protein. In: *Current protocols in protein science*. Hoboken: John Wiley & Sons; 2001. doi: 10.1002/0471140864.ps0304s48.

MacCoss MJ, Wu CC, Yates JR. Probability-based validation of protein identifications using a modified SEQUEST algorithm. *Anal Chem.* 2002 Nov;74(21):5593-9.

McDonald EE, Goldberg HA, Tabbara N, Mendes FM, Siqueira WL. Histatin 1 resists proteolytic degradation when adsorbed to hydroxyapatite. *J Dent Res.* 2011 Feb;90(2):268-72. doi: 10.1177/0022034510388653.

Moffa EB, Machado MAAM, Mussi MCM, Xiao Y, Garrido SS, Giampaolo ET, et al. Identification of histatin 5 salivary complexes. PLoS ONE. 2015;10(11):e0142517. doi:10.1371/journal.pone.0142517

Nascimento F, Minciotti C, Geraldeli S, Carrilho M, Pashley D, Tay F, et al. Cysteine Cathepsins in Human Carious Dentin. J Dent Res. 2011 Apr;90(4):506-11. doi: 10.1177/0022034510391906

Nikitkova AE, Haase EM, Scannapieco FA. Taking the starch out of oral biofilm formation: molecular basis and functional significance of salivary α -amylase binding to oral Streptococci. Appl Environ Microbiol. 2013 Jan;79(2):416-23. doi: 10.1128/AEM.02581-12.

Oppenheim FG, Salih E, Siqueira WL, Zhang W, Helmerhorst EJ. Salivary proteome and its genetic polymorphisms. Ann N Y Acad Sci. 2007 Mar;1098:22-50.

Oppenheim FG, Xu T, McMillian FM, Levitz SM, Diamond RD, Offner GD, et al. Histatins, a novel family of histidine-rich proteins in human parotid secretion. Isolation, characterization, primary structure, and fungistatic effects on *Candida albicans*. J Biol Chem. 1988 Jun;263(16):7472-7.

Pitts NB, Stamm JW. International Consensus Workshop on Caries Clinical Trials (ICW-CCT)—final consensus statements: agreeing where the evidence leads. J Dent Res. 2004; 83 Spec No C:C125-8.

Proctor GB. The physiology of salivary secretion. Periodontol 2000. 2016;70(1):11-25.

Rayment SA, Liu B, Soares RV, Offner GD, Oppenheim FG, Troxler RF. The effects of duration and intensity of stimulation on total protein and mucin concentrations in resting and stimulated whole saliva. J Dent Res. 2001 Jun;80(6):1584-7.

Roa NS, Chaves M, Gomez M, Jaramillo LM. Association of salivary proteins with dental caries in a Colombian population. Acta Odontol Latinoam. 2008;21(1):69-75.

Rudney JD, Staikov RK, Johnson JD. Potential biomarkers of human salivary function: a modified proteomic approach. Arch Oral Biol. 2009 Jan;54(1):91-100. doi: 10.1016/j.archoralbio.2008.08.007.

Sallantin M, Huet J-C, Demarteau C, Pernollet J-C. Reassessment of commercially available molecular weight standards for peptide sodium dodecyl sulfatepolyacrylamide gel electrophoresis using electroblotting and microsequencing. *Electrophoresis*. 1990 Jan;11(1):34-6.

Shaila M, Pai GP, Shetty P. Salivary protein concentration, flow rate, buffer capacity and pH estimation: A comparative study among young and elderly subjects, both normal and with gingivitis and periodontitis. *J Indian Soc Periodontol*. 2013 Jan;17(1):42-6. doi: 10.4103/0972-124X.107473.

Shevchenko A, Tomas H, Havlis J, Olsen JV, Mann M. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat Protoc*. 2007;1(6):2856-60.

Shimotoyodome A, Kobayashi H, Tokimitsu I, Hase T, Inoue T, Matsukubo T, et al. Saliva-promoted adhesion of *Streptococcus mutans* MT8148 associates with dental plaque and caries experience. *Caries Res*. 2007;41(3):212-8.

Siqueira WL, Margolis H, Helmerhorst E, Mendes FM, Oppenheim F. Evidence of Intact Histatins in the in vivo Acquired Enamel Pellicle. *J Dent Res*. 2010 Jun;89(6):626-30. doi: 10.1177/0022034510363384.

Siqueira WL, Dawes C. The salivary proteome: challenges and perspectives. *Proteomics Clin Appl*.. 2011 Dec;5(11-12):575-9. doi: 10.1002/prca.201100046.

Siqueira WL, Oppenheim FG. Small molecular weight proteins/peptides present in the in vivo formed human acquired enamel pellicle. *Arch Oral Biol*. 2009 May;54(5):437-44. doi: 10.1016/j.archoralbio.2009.01.011.

Siqueira WL, Zhang W, Helmerhorst EJ, Gygi SP, Oppenheim FG. Identification of protein components in in vivo human acquired enamel pellicle using LC-ESI-MS/MS. *J Proteome Res*. 2007 Jun;6(6):2152-60.

Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*. 1985 Oct;150(1):76-85. Erratum in *Anal Biochem* 1987 May 15;163(1):279.

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 May;49(5):337-43.

Söderling E, Pienihäkkinen K, Alanen M-L, Hietaoja M, Alanen P. Salivary flow rate, buffer effect, sodium, and amylase in adolescents: a longitudinal study. *Eur J Oral Sci.* 1993 Apr;101(2):98-102.

Tabata T, Sato T, Kuromitsu J, Oda Y. Pseudo Internal Standard Approach for Label-Free Quantitative Proteomics. *Anal Chem.* 2007 Nov;79(22):8440-5.

Takahashi N, Nyvad B. Caries ecology revisited: Microbial dynamics and the caries process. *Caries Res.* 2008;42(6):409-18. doi: 10.1159/000159604.

Tenovuo J. Antimicrobial function of human saliva - how important is it for oral health? *Acta Odontol Scand.* 1998 Oct;56(5):250-6.

Tenovuo J, Lehtonen OP, Aaltonen AS, Vilja P, Tuohimaa P. Antimicrobial factors in whole saliva of human infants. *Infect Immun.* 1986 Jan;51(1):49-53.

Thomas RZ, Van Der Mei HC, Van Der Veen MH, De Soet JJ, Huysmans MCDNJM. Bacterial composition and red fluorescence of plaque in relation to primary and secondary caries next to composite: an in situ study. *Oral Microbiol Immunol.* 2008 Feb;23(1):7-13. doi: 10.1111/j.1399-302X.2007.00381.x.

van Hemert MJ, Steensma HY, van Heusden GPH. 14-3-3 proteins: key regulators of cell division, signalling and apoptosis. *BioEssays.* 2001 Oct;23(10):936-46.

van Nieuw Amerongen A, Bolscher JGM, Veerman ECI. Salivary proteins: protective and diagnostic value in cariology? *Caries Res.* 2004 May-Jun;38(3):247-53.

Vibhakar PA, Patankar SR, Yadav MR, Vibhakar P. Salivary total protein levels and their correlation to dental caries. *Int J Oral Maxillofac Pathol.* 2013;4(3):13-6.

Vitorino R, De Moraes Guedes S, Ferreira R, Lobo MJC, Duarte J, Ferrer-Correia AJ, et al. Two-dimensional electrophoresis study of in vitro pellicle formation and dental caries susceptibility. *Eur J Oral Sci.* 2006 Apr;114(2):147-53.

Voet D, Voet JG. *Biochemistry.* 4^a ed. Hoboken: John Wiley & Sons; 2010.

Vukosavljevic D, Custodio W, Buzalaf MAR, Hara AT, Siqueira WL. Acquired pellicle as a modulator for dental erosion. *Arch Oral Biol.* 2014 Jun;59(6):631-8. doi: 10.1016/j.archoralbio.2014.02.002

Vukosavljevic D, Custodio W, Del Bel Cury AA, Siqueira WL. The effect of histatin 5, adsorbed on PMMA and hydroxyapatite, on *Candida albicans* colonization. *Yeast*. 2012 Nov;29(11):459-66. doi: 10.1002/yea.2925.

Walker JM. The protein protocols handbook. 2^a ed. Totowa:Humana Press; 2007.

Watanabe Y, Mizoguchi H, Masamura K, Nagaya T. No relationship of salivary flow rate or secretory immunoglobulin A to dental caries in children. *Environ Health Prev Med*. 1997 Oct;2(3):122-5.

Xiao H, Zhang L, Zhou H, Lee JM, Garon EB, Wong DTW. Proteomic analysis of human saliva from lung cancer patients using two-dimensional difference gel electrophoresis and mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics*. 2012;11(2):M111.012112. doi: 10.1074/mcp.M111.012112.

ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Western Ontario para realização do estudo

Office of Research Ethics
 The University of Western Ontario
 Room 4180 Support Services Building, London, ON, Canada N6A 5C1
 Telephone: (519) 661-3036 Fax: (519) 850-2486 Email: ethics@uwo.ca
 Website: www.uwo.ca/research/ethics

Use of Human Subjects - Ethics Approval Notice

<p>Principal Investigator: Dr. W.L. Siqueira Review Number: 16181E Review Date: March 24, 2010 Protocol Title: Composition, Structure and Function of Salivary Proteins Department and Institution: Dentistry, University of Western Ontario Sponsor: NSERC-NATURAL SCIENCES ENGINEERING RESEARCH COUNCIL Ethics Approval Date: April 20, 2010</p>	<p>Review Level: Expedited Revision Number: 1 Approved Local # of Participants: 100 Expiry Date: June 30, 2016</p>
---	---

Documents Reviewed and Approved: Revised Letter of Information and Consent. Assent Letter.

Documents Received for Information:

This is to notify you that The University of Western Ontario Research Ethics Board for Health Sciences Research Involving Human Subjects (HSREB) which is organized and operates according to the Tri-Council Policy Statement: Ethical Conduct of Research Involving Humans and the Health Canada/ICH Good Clinical Practice Practices: Consolidated Guidelines; and the applicable laws and regulations of Ontario has reviewed and granted approval to the above referenced revision(s) or amendment(s) on the approval date noted above. The membership of this REB also complies with the membership requirements for REB's as defined in Division 5 of the Food and Drug Regulations.

The ethics approval for this study shall remain valid until the expiry date noted above assuming timely and acceptable responses to the HSREB's periodic requests for surveillance and monitoring information. If you require an updated approval notice prior to that time you must request it using the UWO Updated Approval Request Form.

During the course of the research, no deviations from, or changes to, the protocol or consent form may be initiated without prior written approval from the HSREB except when necessary to eliminate immediate hazards to the subject or when the change(s) involve only logistical or administrative aspects of the study (e.g. change of monitor, telephone number). Expedited review of minor change(s) in ongoing studies will be considered. Subjects must receive a copy of the signed information/consent documentation.

Investigators must promptly also report to the HSREB:

- a) changes increasing the risk to the participant(s) and/or affecting significantly the conduct of the study;
- b) all adverse and unexpected experiences or events that are both serious and unexpected;
- c) new information that may adversely affect the safety of the subjects or the conduct of the study.

If these changes/adverse events require a change to the information/consent documentation, and/or recruitment advertisement, the newly revised information/consent documentation, and/or advertisement, must be submitted to this office for approval.

Members of the HSREB who are named as investigators in research studies, or declare a conflict of interest, do not participate in discussion related to, nor vote on, such studies when they are presented to the HSREB.

Chair of HSREB: Dr. Joseph Gilbert
 FOA Ref. #: 99B 00000940

Ethics Officer to Contact for further information

☐ Janice Sutherland <small>(jsuth@uwo.ca)</small>	☐ Elizabeth Wambolt <small>(ewambolt@uwo.ca)</small>	☒ Grace Kelly <small>(grace.kelly@uwo.ca)</small>	☐ Denise Grafton <small>(dgrafton@uwo.ca)</small>
---	--	--	---

This is an official document. Please retain the original in your files.

UWO HSREB Ethics Approval - Revision
 V.2008-07-01 (pdfApprovalNoticeHSREB_REV)

16181E

cc: ORE File
 Page 1 of 1

ANEXO B – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da USP para realização do estudo

Continuação do Parecer: 803.821

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A participação e a colaboração em pesquisas desenvolvidas em outros centros é de fundamental importância na formação de novos pesquisadores, e no melhor conhecimento de patologias, que em breve poderão estar controladas.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos obrigatórios foram apresentados, com as respectivas traduções e a aprovação do comitê de ética local, não havendo impedimento ético. Esta pesquisa é continuação, parte de uma outra maior já em andamento na Universidade de Western Ontario em London, Ontario, Canadá.

Recomendações:

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP-FODUSP relatórios parciais, anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final ao término do trabalho. Qualquer modificação do projeto original deve ser reapresentado a este CEP, de forma objetiva e com justificativas para nova apreciação.

Conclusões ou Pendências e Lista de inadequações:

As solicitações anteriores foram atendidas, não havendo pendências.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Sim

Considerações Finais a critério do CEP:

O presente projeto, seguiu nesta data para análise da CONEP e só tem o seu início autorizado após a aprovação pela mesma.

SAO PAULO, 24 de Setembro de 2014

Assinado por:
Maria Gabriela Haye Blazevic
 (Coordenador)

ANEXO C – Parecer da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa sobre o projeto referente ao presente estudo

Continuação do Parecer: P13.428

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

No documento intitulado "PE_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_295716.pdf", lê-se no item "Tamanho da Amostra no Brasil: "0". Ainda no mesmo documento, no item "Outras informações, justificativas ou considerações a critério do pesquisador", lê-se: "Este ESTUDO SERÁ TOTALMENTE REALIZADO NA UNIVERSITY OF WESTERN ONTARIO e está inserido numa linha de pesquisa que já possui aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa dessa instituição.

Assim, como não há participantes de pesquisa no Brasil, a CONEP não procederá com a análise do projeto em tela.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Não se aplica

Recomendações:

Não se aplica

Conclusões ou Pendências e Lista de inadequações:

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/2012 e na Norma Operacional Nº 001/2013 do CNS, manifesta-se pela retirada do estudo. Dessa forma, a CONEP não procederá com a análise do projeto de pesquisa.

Situação do Parecer:

Retirado

Considerações Finais a critério da CONEP:

A CONEP, diante do exposto, não emitirá parecer sobre a presente proposição.

Situação do protocolo: Retirado.

BRASILIA, 14 de Dezembro de 2014

Assinado por:

Jorge Alvec de Almeida Venanolo
(Coordenador)

APÊNDICE A - Resultado da parte IV: tabela contendo os valores individuais das intensidades de cada banda ajustadas pelos valores do plano de fundo

Gel 1																
	Banda	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	B11	B12	B13	B14	B15
Peso Molecular (kDa)		133.5	109.7	101.2	90.8	80.1	74.7	68.1	60.4	56.3	43.6	32.8	28.9	14.0	9.7	8.5
Lane 2 - #13	Adj. Vol. (Int)	190485.14	566121.14	528473.14	1110033.14	1792617.14	3009437.14	478977.14	449681.14	454373.14	209645.14	398637.14	511449.14	299649.14	2053509.14	908573.14
Lane 3 - #35	Adj. Vol. (Int)	311693.14	709145.14	635685.14	1855705.14	2202453.14	3346805.14	1112945.14	725885.14	766157.14	452941.14	661693.14	911653.14	407517.14	996037.14	786541.14
Lane 4 - #34	Adj. Vol. (Int)	538701.14	922577.14	880029.14	2913953.14	2508713.14	3121337.14	1698865.14	1161705.14	908925.14	786081.14	964249.14	1417565.14	521417.14	884045.14	989421.14
Lane 5 - #19	Adj. Vol. (Int)	394577.14	752745.14	721741.14	2319889.14	1422665.14	2723941.14	1303133.14	670577.14	589129.14	329885.14	551117.14	809417.14	321729.14	1337893.14	708849.14
Grupo CA	Média	358,864.14	737,647.14	691,482.14	2,049,895.14	1,981,612.14	3,050,380.14	1,148,480.14	751,962.14	679,646.14	444,638.14	643,924.14	912,521.14	387,578.14	1,317,871.14	848,346.14
	Desvio padrão	146,279.82	146,811.20	148,493.94	761,696.20	474,252.77	258,934.63	508,703.65	298,086.48	199,160.12	248,356.08	239,236.77	377,076.20	100,628.10	527,050.37	124,911.59
Lane 2 - #7	Adj. Vol. (Int)	520,797.33	879,345.33	706,609.33	1,127,349.33	1,964,873.33	2,594,461.33	572,773.33	602,433.33	616,193.33	424,805.33	629,565.33	829,373.33	468,929.33	1,262,441.33	606,925.33
Lane 3 - #26	Adj. Vol. (Int)	435,869.33	988,645.33	810,141.33	2,292,353.33	2,378,657.33	3,038,709.33	1,474,793.33	732,713.33	734,029.33	450,897.33	551,317.33	1,124,913.33	453,457.33	1,732,269.33	699,005.33
Lane 4 - #8	Adj. Vol. (Int)	573,965.33	945,661.33	803,785.33	1,681,505.33	2,125,709.33	2,917,017.33	654,517.33	638,373.33	621,921.33	500,261.33	653,169.33	882,777.33	479,417.33	1,549,053.33	811,689.33
Lane 5 - #27	Adj. Vol. (Int)	429,905.33	744,693.33	716,109.33	1,669,433.33	1,921,881.33	2,711,041.33	889,769.33	669,837.33	669,273.33	413,125.33	617,425.33	1,023,189.33	359,533.33	1,564,697.33	934,189.33
Grupo MB	Média	490,134.33	889,586.33	759,161.33	1,692,660.33	2,097,780.33	2,815,307.33	897,963.33	660,839.33	660,354.33	447,272.33	612,869.33	965,063.33	440,334.33	1,527,115.33	762,952.33
	Desvio padrão	69,618.19	106,545.69	55,393.89	476,050.47	206,782.21	199,914.76	407,355.08	55,265.47	54,573.63	38,694.35	43,635.81	134,304.90	54,912.57	194,965.10	131,575.71
Lane 2 - #36	Adj. Vol. (Int)	445,435.81	604,271.81	543,839.81	866,303.81	1,642,947.81	2,759,151.81	474,807.81	532,479.81	517,599.81	298,155.81	361,151.81	458,691.81	448,295.81	1,392,359.81	537,271.81
Lane 3 - #25	Adj. Vol. (Int)	370,655.81	758,427.81	534,147.81	947,227.81	1,444,295.81	1,936,811.81	456,879.81	454,335.81	461,551.81	327,831.81	455,783.81	798,115.81	299,167.81	1,288,679.81	566,615.81
Lane 4 - #49	Adj. Vol. (Int)	272,251.81	545,191.81	547,495.81	891,783.81	1,802,423.81	2,877,503.81	569,975.81	581,871.81	549,275.81	340,463.81	442,419.81	607,071.81	336,975.81	705,263.81	521,475.81
Lane 5 - #10	Adj. Vol. (Int)	354,863.81	635,275.81	640,979.81	1,515,243.81	1,856,271.81	2,639,079.81	588,527.81	572,175.81	472,235.81	242,871.81	361,595.81	574,927.81	272,735.81	654,259.81	444,511.81
Grupo CO	Média	360,801.81	635,791.81	566,615.81	1,055,139.81	1,686,484.81	2,553,136.81	522,547.81	535,215.81	500,165.81	302,330.81	405,237.81	609,701.81	339,293.81	1,010,140.81	517,468.81
	Desvio padrão	71,031.40	89,892.02	49,894.88	308,590.83	185,131.00	422,255.39	66,317.84	57,999.67	40,771.16	43,425.15	50,943.10	140,854.54	77,302.16	384,394.16	52,110.03

Gel 2																
	Banda	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	B11	B12	B13	B14	B15
Peso Molecular (kDa)		133.1	106.5	98.1	87.5	76.3	71.8	66.0	57.5	53.6	43.2	29.5	26.7	13.3	9.5	8.4
Lane 2 - #13	Adj. Vol. (Int)	304401.89	452273.89	419965.89	836257.89	1523657.89	2615953.89	434193.89	419909.89	398377.89	230041.89	303285.89	409625.89	330045.89	2114997.89	866909.89
Lane 3 - #35	Adj. Vol. (Int)	256245.89	523273.89	536041.89	1341377.89	1693377.89	2825285.89	2153381.89	485061.89	502525.89	331913.89	374581.89	502673.89	286841.89	714049.89	551545.89
Lane 4 - #34	Adj. Vol. (Int)	349677.89	637353.89	759509.89	2591825.89	1911953.89	2623121.89	1159369.89	700549.89	666169.89	445405.89	642789.89	835009.89	347213.89	706361.89	678297.89
Lane 5 - #19	Adj. Vol. (Int)	401077.89	657305.89	657905.89	2115153.89	1522977.89	2365701.89	1125649.89	618157.89	462757.89	319129.89	484649.89	602129.89	286121.89	1128629.89	520477.89
Grupo CA	Média	327,850.89	567,551.89	593,355.89	1,720,243.89	1,662,991.89	2,607,515.89	1,218,148.89	555,919.89	507,457.89	331,622.89	451,326.89	591,859.89	312,555.89	1,166,009.89	654,307.89
	Desvio padrão	61,956.28	96,915.18	147,335.04	782,670.23	184,321.52	188,159.98	707,403.05	126,900.20	114,178.75	88,358.04	147,845.00	191,021.96	30,914.09	662,701.44	157,316.70
Lane 2 - #7	Adj. Vol. (Int)	647,866.63	1,256,498.63	954,062.63	1,585,202.63	2,377,690.63	3,218,362.63	740,686.63	812,314.63	816,770.63	484,778.63	940,566.63	1,233,342.63	692,826.63	2,107,922.63	1,003,622.63
Lane 3 - #26	Adj. Vol. (Int)	477,630.63	1,326,942.63	1,156,070.63	2,584,502.63	2,907,766.63	3,364,834.63	1,355,834.63	962,458.63	951,866.63	568,574.63	937,266.63	1,541,342.63	684,610.63	2,572,626.63	1,119,378.63
Lane 4 - #8	Adj. Vol. (Int)	554,318.63	1,172,994.63	1,021,342.63	2,112,602.63	2,609,446.63	3,203,206.63	831,930.63	834,050.63	783,666.63	535,514.63	879,770.63	1,160,022.63	602,022.63	2,133,682.63	1,126,694.63
Lane 5 - #27	Adj. Vol. (Int)	516,198.63	1,046,378.63	1,012,762.63	2,175,394.63	2,615,298.63	3,055,902.63	1,312,618.63	950,154.63	870,334.63	672,058.63	1,027,706.63	1,327,758.63	462,250.63	2,072,254.63	1,289,370.63
Grupo MB	Média	549,003.63	1,200,703.63	1,036,059.63	2,114,425.63	2,627,550.63	3,210,576.63	1,060,267.63	889,744.63	855,659.63	565,231.63	946,327.63	1,315,616.63	610,427.63	2,221,621.63	1,134,766.63
	Desvio padrão	72,966.69	120,600.39	85,411.73	410,190.98	217,124.31	126,272.87	319,014.46	77,532.62	73,408.65	79,117.99	61,012.75	165,406.73	106,957.59	235,354.87	117,477.79
Lane 2 - #36	Adj. Vol. (Int)	385,398.91	733,338.91	738,626.91	1,268,182.91	2,039,138.91	3,063,474.91	694,898.91	726,746.91	730,786.91	390,178.91	529,166.91	658,342.91	661,362.91	2,262,034.91	849,870.91
Lane 3 - #25	Adj. Vol. (Int)	451,270.91	955,550.91	729,114.91	1,272,766.91	1,923,802.91	2,561,758.91	615,362.91	572,298.91	619,270.91	395,546.91	819,286.91	1,082,930.91	449,590.91	2,049,238.91	898,342.91
Lane 4 - #49	Adj. Vol. (Int)	325,654.91	673,694.91	735,358.91	1,233,906.91	2,052,574.91	3,067,150.91	797,078.91	772,950.91	700,498.91	471,806.91	666,598.91	789,174.91	485,726.91	1,121,086.91	836,826.91
Lane 5 - #10	Adj. Vol. (Int)	398,298.91	855,018.91	920,862.91	2,047,282.91	2,552,042.91	3,177,278.91	860,690.91	794,918.91	738,002.91	355,606.91	574,998.91	1,082,438.91	494,790.91	1,373,150.91	681,138.91
Grupo CO	Média	390,155.91	809,400.91	780,990.91	1,455,534.91	2,141,889.91	2,967,415.91	742,007.91	716,728.91	697,139.91	403,284.91	572,512.91	903,221.91	522,867.91	1,701,377.91	816,544.91
	Desvio padrão	51,589.27	122,474.34	93,331.46	394,879.55	279,477.11	275,544.60	108,592.02	100,390.86	54,395.98	48,990.14	127,977.39	213,998.83	94,371.88	541,545.37	94,070.33

Gel 3																
	Banda	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Peso Molecular (kDa)		142,3	111,1	102,0	91,1	78,9	74,0	68,3	59,8	55,4	44,4	32,8	28,5	14,0	9,8	8,6
Lane 2 - #13	Adj. Vol. (Int)	450583.01	959687.01	930399.01	1878379.01	2326751.01	3260499.01	821219.01	772555.01	762423.01	345299.01	623215.01	869079.01	467707.01	2899311.01	1625755.01
Lane 3 - #35	Adj. Vol. (Int)	537627.01	968271.01	933647.01	2223487.01	2245179.01	3271763.01	1494071.01	772859.01	840391.01	424563.01	458419.01	628351.01	231679.01	945047.01	888355.01
Lane 4 - #34	Adj. Vol. (Int)	882731.01	1531843.01	1555715.01	3301151.01	2691155.01	330735.01	2204475.01	1653527.01	1340979.01	737391.01	1118355.01	1521167.01	396647.01	974679.01	1330099.01
Lane 5 - #19	Adj. Vol. (Int)	704835.01	1305963.01	1347807.01	2955871.01	2410099.01	3150387.01	1965691.01	1113335.01	863551.01	337067.01	759655.01	1143491.01	259607.01	1823047.01	920019.01
Grupo CA	Média	643,944.01	1,191,441.01	1,191,892.01	2,589,722.01	2,418,296.01	3,253,346.01	1,621,364.01	1,078,069.01	951,836.01	461,080.01	739,911.01	1,040,522.01	338,910.01	1,660,521.01	1,191,057.01
	Desvio padrão	190,978.82	278,390.36	311,847.04	653,282.29	193,966.67	75,232.89	609,648.82	415,887.62	263,010.64	188,384.11	280,752.20	383,362.26	112,115.54	920,742.03	352,791.31
Lane 2 - #7	Adj. Vol. (Int)	625,749.05	1,468,133.05	1,128,037.05	2,011,617.05	2,536,569.05	3,090,997.05	894,909.05	925,417.05	863,577.05	553,821.05	665,973.05	1,469,137.05	689,181.05	2,376,465.05	1,214,057.05
Lane 3 - #26	Adj. Vol. (Int)	633,269.05	1,528,553.05	1,390,049.05	2,890,357.05	2,880,273.05	3,278,877.05	2,143,685.05	1,070,269.05	1,091,661.05	582,165.05	678,949.05	1,841,865.05	743,737.05	2,810,965.05	1,499,589.05
Lane 4 - #8	Adj. Vol. (Int)	626,017.05	1,241,045.05	1,283,657.05	2,476,429.05	2,749,501.05	3,187,209.05	1,531,021.05	986,117.05	938,833.05	590,197.05	1,037,873.05	1,570,017.05	708,589.05	2,583,605.05	1,601,857.05
Lane 5 - #27	Adj. Vol. (Int)	622,957.05	1,235,365.05	1,428,981.05	2,632,849.05	2,732,645.05	3,191,197.05	1,490,281.05	1,241,925.05	610,435.05	650,365.05	1,101,877.05	1,470,733.05	385,345.05	2,317,813.05	1,637,981.05
Grupo MB	Média	626,998.05	1,435,774.05	1,368,681.05	2,503,549.05	2,724,747.05	3,187,070.05	1,504,474.05	1,048,922.05	978,623.05	612,337.05	948,193.05	1,581,188.05	631,713.05	2,522,212.05	1,488,371.05
	Desvio padrão	4,403.69	85,755.74	134,594.82	369,147.36	144,744.41	76,758.49	509,996.96	124,127.17	99,899.76	55,394.33	159,829.94	162,773.34	165,790.29	223,732.38	193,048.39
Lane 2 - #36	Adj. Vol. (Int)	503,333.69	980,281.36	971,825.36	1,791,885.36	2,182,714.36	3,245,453.36	858,101.36	873,313.36	819,765.36	580,677.36	544,821.36	1,102,629.36	808,421.36	2,512,609.36	1,159,897.36
Lane 3 - #25	Adj. Vol. (Int)	614,057.36	1,318,361.36	980,289.36	1,773,385.36	2,268,389.36	2,560,877.36	761,441.36	817,105.36	826,157.36	556,505.36	717,245.36	1,497,845.36	486,685.36	2,395,113.36	1,199,325.36
Lane 4 - #49	Adj. Vol. (Int)	537,145.36	1,100,853.36	1,018,513.36	1,836,449.36	2,649,657.36	3,264,921.36	1,090,161.36	1,106,461.36	948,394.36	644,285.36	669,329.36	1,115,069.36	530,633.36	1,524,249.36	1,227,461.36
Lane 5 - #10	Adj. Vol. (Int)	593,773.36	1,199,941.36	1,313,521.36	2,317,257.36	2,760,925.36	3,143,389.36	1,142,077.36	1,055,325.36	962,221.36	550,605.36	720,601.36	1,417,025.36	550,097.36	1,825,435.36	1,000,989.36
Grupo CI	Média	562,077.36	1,127,359.36	1,017,037.36	1,929,744.36	2,501,732.36	3,053,660.36	962,920.36	963,551.36	923,063.36	598,018.36	662,999.36	1,260,142.36	593,964.36	2,068,856.36	1,155,918.36
	Desvio padrão	50,921.57	160,161.89	162,926.96	259,694.34	210,571.33	332,817.34	182,430.69	139,137.95	99,208.64	42,866.72	82,192.31	234,106.75	145,411.42	1,068,851.46	1,104,249.51

APÊNDICE B - Resultado da parte V: tabela contendo os valores individuais das intensidades de cada banda ajustadas pelos valores do plano de fundo

	MB High	CO High	MB Low	CO Low	MB Int1	CO Int1	MB Int2	CO Int2
	MB26	CO10	MB7	CO36	MB8	CO25	MB27	CO49
Band	Adj. Vol. (Int)	Adj. Vol. (Int)	Adj. Vol. (Int)	Adj. Vol. (Int)	Adj. Vol. (Int)	Adj. Vol. (Int)	Adj. Vol. (Int)	Adj. Vol. (Int)
1	228,359.26	286,351.26	246,227.26	160,979.26	437,294.73	398,786.73	486,378.73	311,838.73
2	816,419.26	583,951.26	873,535.26	477,991.26	867,366.73	917,414.73	755,998.73	572,262.73
3	924,059.26	733,735.26	691,711.26	561,415.26	746,226.73	659,954.73	755,822.73	630,342.73
4	2,083,931.26	1,720,963.26	1,060,419.26	1,113,207.26	1,516,242.73	1,394,162.73	1,882,170.73	1,275,110.73
5	2,449,535.26	2,257,867.26	2,029,571.26	2,148,411.26	2,166,526.73	2,014,558.73	2,192,082.73	2,246,890.73
6	2,879,779.26	2,644,235.26	2,526,135.26	2,810,759.26	2,692,962.73	2,299,198.73	2,660,494.73	2,876,158.73
7	1,592,331.26	773,431.26	818,875.26	609,215.26	1,002,718.73	696,534.73	1,190,494.73	936,706.73
8	624,639.26	558,867.26	556,007.26	498,471.26	609,422.73	492,270.73	754,926.73	675,554.73
9	638,407.26	500,507.26	583,591.26	554,631.26	587,738.73	556,462.73	694,262.73	635,562.73
10	387,919.26	215,219.26	397,075.26	282,891.26	487,290.73	369,682.73	536,086.73	334,026.73
11	663,779.26	460,395.26	652,735.26	338,315.26	824,654.73	772,522.73	808,338.73	496,902.73
12	1,258,847.26	804,831.26	1,052,239.26	555,307.26	1,023,882.73	1,060,442.73	1,146,754.73	727,270.73
13	400,083.26	271,403.26	400,075.26	421,963.26	283,538.73	184,866.73	267,854.73	222,046.73
14	2,176,599.26	1,307,135.26	1,921,771.26	2,340,147.26	1,942,242.73	1,991,622.73	2,125,214.73	1,206,830.73
15	2,183,123.26	1,503,663.26	2,143,483.26	2,313,023.26	2,396,162.73	2,105,474.73	2,607,922.73	2,353,886.73