CAMILLA VIEIRA ESTEVES DOS SANTOS

**Avaliação proteômica da saliva da glândula parótida sob fluxo contínuo: um
estudo exploratório**

São Paulo
2019

CAMILLA VIEIRA ESTEVES DOS SANTOS

Avaliação Proteômica da Saliva da Glândula Parótida sob fluxo contínuo: Um estudo exploratório

Versão Original

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

Orientador: Prof. Dr. Celso Augusto Lemos Júnior

São Paulo

2019

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-na-Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Santos, Camilla Vieira Esteves dos.

Avaliação proteômica da saliva da glândula parótida sob fluxo contínuo: um estudo exploratório / Camilla Vieira Esteves dos Santos ; orientador Celso Augusto Lemos Júnior. -- São Paulo, 2019.

168 p. : tab., fig., graf. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) -- Programa de Pós-Graduação em XXXXX. Área de Concentração: Diagnóstico Bucal . -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão original

1. Proteômica. 2. Espectrometria de massas. 3. Eletroforese. 4. Saliva. I. Lemos Júnior, Celso Augusto. II. Título.

Santos CVE. Avaliação proteômica da saliva da glândula parótida sob fluxo contínuo: um estudo exploratório. Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovado em: / /2019

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: _____

A Deus por proporcionar minha evolução na seara do bem

A minha família, em especial aos meus queridos pais Ana Cristina e Félix, por terem me proporcionado a oportunidade e apoio na continuação dos meus estudos até agora

A minha querida irmã Bruna

AGRADECIMENTOS

Ao meu querido orientador, Prof. Dr. Celso Augusto Lemos por sua dedicação em todos esses anos, pelo incentivo em fazer o Doutorado Sanduíche e pelo apoio oferecido que auxiliou no meu crescimento profissional.

A Prof. Dra. Silvia Lourenço, pela oportunidade de crescimento profissional e o apoio necessário para a realização do Doutorado Sanduíche.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Walter Siqueira pela confiança e pela acolhida na Western University.

Agradeço imensamente o apoio de todos os professores doutores da disciplina de Estomatologia pela acolhida e pelo carinho em todos esses anos: Andréa Witzel, Camila de Barros Gallo, Fábio Abreu Alves e Norberto Nobuo Sugaya.

A Prof. Dra. Eliete Guerra, por todos os ensinamentos na área de Revisão Sistemática.

Aos colegas do Programa de Pós-graduação: Giovanna Florezi, Gisele Artes, Rosane Gallo, Sabrina Pinho, Andresa Gonçalves, André Camilo, Thais Gimenes, Wilber Bernaola, Samanta Vicente, Cibele Nagano e Milena Antunes por todos os momentos de descontração e apoio, o que tornaram a realização do trabalho mais suave.

Aos queridos amigos que a FOU SP me deu: Fernanda Salineiro, Solange Velasco, Wellington Yanaguizawa e Durval Toledo.

As queridas amigas que a Clínica de Estomatologia me deu: Elza Padilha e Clery.

As queridas alunas da graduação, que tanto me ajudaram na clínica de Estomatologia: Dani e Tamires

Aos meus queridos “irmãos”: Wladimir Gushiken e Kaiser Costa, por todo o apoio oferecido.

A minha querida “Family Trip”: Cláudia e Lina, sem vocês o Canadá teria sido muito mais gelado. Agradeço pelo companheirismo, amizade e acolhida.

Aos queridos amigos do Siqueira Lab: Camilinha, Karlinha, David, Naima e Natália.

As colegas da Western University: Mel e Manuzita

To Yizhi Xiao (Cindy), thanks for all efforts.

Para Aparecida Ferreira Andrade (Cida), Laerte Zanon e Maria Cecília Forte Muni pela amizade e pela disponibilidade ímpar em ajudar

Para a querida Nina, que se tornou uma grande amiga com o decorrer desses anos.

A Glauci e Vânia, do SDO/FOUSP, por sua disponibilidade em ajudar nos momentos finais deste trabalho.

A todos os voluntários, que acreditaram no projeto e se disponibilizaram, pois sem eles este trabalho não seria possível.

A todos os amigos, que incondicionalmente estiveram presentes em todos os momentos da minha vida, seja pessoalmente ou apenas com mensagens de apoio.

A CAPES pela bolsa de Doutorado do programa Demanda Social e pela bolsa do edital PDSE.

A todos que me apoiaram a chegar até aqui.

"A felicidade que mais repercute em nós é a que foi alcançada pelo esforço, pelo empenho que não nos dispensou da dor, do caminho árduo e da decepção. A felicidade que mais derrama alegrias sobre nós é a que sabemos ter merecido. A consciência não se engana. Troca grandes feitos herdados por pequenos feitos conquistados. Ela tudo sabe. Felicidade sem esforço é desprovida de valor. Pode até provocar encanto em outros, mas não provoca em que a hospeda"

Pe Fábio de Melo

RESUMO

Santos CVE. Avaliação Proteômica da Saliva da Glândula Parótida sob fluxo contínuo: Um estudo exploratório [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de odontologia; 2019. Versão Original.

A saliva humana é um fluido, que exerce diversas funções na saúde oral e geral. A análise do proteoma das glândulas salivares em especial da glândula parótida, são importantes para a compreensão das proteínas individuais presentes na saliva humana e do seu comportamento na saúde, para desta forma entender a patogênese de certas doenças. Esse trabalho é um catálogo de todas as proteínas expressas na saliva da glândula parótida de indivíduos saudáveis em fluxo contínuo de alta intensidade (1ml/min), de baixa intensidade (0,25ml/min) e na situação de estresse. Também foram realizadas as análises quantitativas e qualitativas da saliva avaliada em pool salivar ou individualmente. As proteínas foram identificadas através de técnicas em espectrometria de massas. Os resultados mostraram uma grande variação individual e as proteínas identificadas estão envolvidas em numerosos processos celulares, desde função estrutural até atividades catalíticas/enzimáticas. Esse estudo tenta, pela primeira vez, criar um padrão ouro para a coleta salivar, possibilitando a comparação entre pesquisas para melhor compreensão da composição salivar.

Palavras-chaves: Proteômica, Espectrometria de Massas, Diagnóstico, Eletroforese, Saliva.

ABSTRACT

Santos CVE. Proteomic profile of parotid saliva under continuous flux: an exploratory study [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de odontologia; 2019. Versão Original.

Human saliva is a fluid that performs various functions in oral and general health. The analysis of the proteome of the salivary glands, especially the parotid gland, are important to understanding the individual proteins present in human saliva and their behavior in health. This work is a catalog of all the proteins expressed in saliva of the parotid gland of healthy individuals in continuous flow of high intensity (1ml / min), low intensity (0.25ml / min) and in the stress situation. Quantitative and qualitative analyzes of saliva evaluated in a salivary pool or individually were also performed. Proteins were identified by mass spectrometric techniques. The results showed a large individual variation and the proteins identified are involved in numerous cellular processes, from structural function to catalytic / enzymatic activities. This study attempts, for the first time, to create a gold standard for salivary collection, making it possible to compare researches for a better understanding of salivary composition.

Keywords: Proteomics, Mass spectrometry, Diagnosis, Electrophoresis, Saliva.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
2	REVISÃO DE LITERATURA	23
3	PROPOSIÇÃO	33
4	MATERIAL E MÉTODOS	35
5	RESULTADOS	49
6	DISCUSSÃO	111
7	CONCLUSÕES	119
	REFERÊNCIAS	121
	APÊNDICES	129
	ANEXOS	155

1 INTRODUÇÃO

Os componentes da saliva humana contribuem para a homeostase e possuem importantes funções muito bem estabelecidas, tais como: lubrificação da mucosa e do alimento ingerido, proteção e manutenção da integridade bucal, neutralização dos ácidos das bactérias e alimentos, regulação da agregação bacteriana na superfícies dentais e ajuda no *clearance* da cavidade bucal^{1,2}.

A saliva total é uma mistura complexa de produtos microbianos, exsudato da mucosa, fluído crevicular gengival, restos de células epiteliais e uma mistura de secreções exócrinas dividida em dois componentes principais: mucosos e serosos provenientes das glândulas salivares maiores e menores. As glândulas salivares maiores são encontradas pareadas incluindo a parótida, submandibular e sublingual. As glândulas salivares menores são encontradas por toda a mucosa incluindo a língua, palato, mucosa jugal e mucosa labial^{1,3-5}. A glândula parótida, por exemplo, secreta apenas o componente seroso⁶ e é a maior das glândulas salivares, pesando aproximadamente 15-30 g⁶ com fluxo em torno de 0,1 mL / min e taxa de fluxo estimulada em torno de 1,05 mL / min.

Colin Dawes⁷ acredita que para se ter a correta interpretação de mudanças na composição salivar, primeiramente, deve-se considerar as variações fisiológicas, como por exemplo, o ritmo circadiano em pacientes saudáveis. Mudanças na composição do plasma em diferentes momentos do dia, no padrão secretório da própria glândula e diferenças na taxa média de fluxo salivar devem ser também consideradas.

Para verificar a influência dos ritmos circadianos na composição salivar humana descritos anteriormente, Colin Dawes⁷ realizou um experimento com coleta de secreção salivar diretamente do ducto da glândula parótida, estimulada a uma taxa de fluxo contínuo de 1mL / min (para minimizar os efeitos do fluxo salivar) em diferentes períodos (07:00, 11:00, 14:00, 17:00 e 22:00 h), na qual se obteve uma alta amplitude na concentração total de proteína de acordo com o período coletado, porém sem relação direta com o fluxo salivar, uma vez que esse foi mantido constante.

No campo da proteômica, a análise do proteoma das glândulas salivares individuais, em especial da glândula parótida, são muito importantes para o entendimento das proteínas individuais presentes na saliva humana, uma vez que as secreções glandulares possuem menor influência do microambiente oral quando comparado com a saliva total, desta forma a compreensão de patogênese de determinadas doenças se torna mais clara.

Como já descrito anteriormente, os ritmos circadianos foram identificados como uma variável muito importante, uma vez que a composição salivar possa ter influência direta, assim o conceito de valores normais nos estudos que envolvem a saliva como ferramenta diagnóstica pode ter um impacto considerável, principalmente na documentação de possíveis biomarcadores em doenças, uma vez até este momento não se tem documentado o padrão de normalidade das proteínas expressas em estímulo constante.

Dadas as numerosas variáveis em relação às fontes e composição da saliva humana, uma nova abordagem se faz necessária, para compilar um catálogo abrangente das proteínas que compõem esse fluido corporal. Em geral, os métodos baseados em espectrometria de massa (MS) são de maior utilidade, porque são imparciais, não requerendo conhecimento prévio da composição proteica⁴, utilizando algoritmos de busca em um banco de dados para identificação das proteínas.

Em vista do apresentado, o objetivo principal desse estudo é de realizar um compêndio de todas as proteínas expressas na glândula parótida de pacientes saudáveis sob fluxo contínuo (a glândula parótida foi treinada para secretar 1 ml / min e 0,25 ml/min) por um período de 30 minutos, combinando métodos bioquímicos clássicos com os de última geração e utilizando análises qualitativas e quantitativas.

2 REVISÃO DA LITERATURA

A revisão de literatura será dividida em três tópicos, sendo o primeiro com a descrição das glândulas salivares, formação da saliva e as mudanças com o estresse; o segundo será composto por um artigo aceito e elaborado por nosso grupo com a descrição da técnica em proteômica, e o terceiro e último tópico, será uma revisão sistemática com todas as proteínas catalogadas na literatura encontradas na secreção da glândula parótida.

2.1 SALIVA E GLÂNDULAS SALIVARES

A saliva é um fluido importante que lubrifica a mucosa bucal e ajuda na formação do bolo alimentar, protege e mantém a integridade do tecido, neutraliza os ácidos das bactérias e alimentos e limpa a cavidade bucal^{2,6,8,9}. A saliva total deriva de glândulas salivares maiores, compreendendo duas glândulas parótidas, duas submandibulares e duas sublinguais; glândulas salivares menores; e fluido crevicular, produzindo no total entre 600 e 1200 mL / dia¹⁰.

É considerada uma secreção exócrina que pode ser dividida em componentes mucosos e serosos. A glândula parótida secreta apenas o componente seroso, a glândula submandibular secreta uma mistura de componentes mucosos e serosos, enquanto as glândulas sublingual e menor secretam apenas componentes mucosos^{1,11}.

A secreção salivar é mantida por uma taxa considerada padrão que é responsável pela reposição ou reabastecimento de proteínas que são absorvidas pelo tecidos moles e duros da cavidade oral². A partir disso podemos considerar que há dois tipos de saliva, a estimulada, a qual é responsável pela secreção de grandes volumes devido a algum estímulo gustatório, olfativo ou simplesmente a própria mastigação e a não estimulada ou saliva residual, que é resultante da saliva estimulada; lembrando que esse é um termo por conveniência, uma vez que a saliva só pode ser considerada não estimulada, quando essa tem total

ausência de atividade neural, o que não é aplicado a um indivíduo em estado de consciência².

A contribuição das glândulas salivares na saliva total é de 28% para a glândula parótida, 68% para as glândulas submandibular e sublingual e 4% das glândulas salivares menores em situação de repouso. Quando mudamos para a situação de estímulo, por exemplo, quando estamos nos alimentando, a contribuição das glândulas mudam, sendo a maior parte da saliva total constituída por saliva da glândula parótida (53%), da glândula submandibular e sublingual (46%) e apenas 1% para as glândulas salivares menores^{2,12}.

2.1.1 Glândula Parótida

É a maior das glândulas salivares maiores, medindo em média 6x4 cm e pesando por volta de 15 a 30g. Possui localização bilateral e está posicionada em frente a orelha, estendendo-se até as bordas inferiores da mandíbula⁶ (Figura 2.1). Aproximadamente 75% da glândula superpõem-se ao músculo masseter e o restante se encontra na região retromandibular¹³.

Figura 2.1 – Ilustração demonstrando a localização da glândula Parótida

Fonte: Atlas de anatomia da cabeça e pescoço¹³

Anatomicamente a glândula é dividida em base, ápice e em região lateral, anterior e posterior. Dentro da glândula parótida o nervo facial se divide e os

troncos formam um anel anterior à glândula e superficialmente ao ducto. O nervo facial não proporciona nenhuma inervação^{6,13}.

Todo o conteúdo salivar é expelido pelo ducto parotídeo, conhecido antigamente como ducto de Stensen. O ducto surge da parte profunda, cruzando a parte anterior do músculo masseter, perfurando o músculo bucinador e abrindo-se na cavidade oral na região do segundo molar superior. Geralmente o tecido ductular é acompanhado por tecido parotídeo acessório¹³.

Histologicamente a glândula é composta por ácinos, que são compostos por células acinares serosas, em forma piramidal e com seus ápices voltados para um único centro (lúmen), formando uma estrutura esférica. A região basal das células acinares contém muito RNA e a região apical é repleta de grânulos de secreção¹⁴. As células serosas da glândula parótida possuem núcleo, numerosos retículos endoplasmáticos, poucas mitocôndrias e um grande complexo de Golgi. Essas células secretam a saliva primária que é mais parecida com o plasma¹.

Também são encontradas células mioepiteliais situadas entre a lâmina basal e as células secretoras que possuem funções contráteis e na presença de um estímulo, se contraem para empurrar seu conteúdo do lúmen ao ducto^{6,14}.

A porção secretora das glândulas salivares é formada por um sistema ductal composto por ácinos, ducto intercalar, ducto estriado e ducto excretório. No decorrer da passagem da saliva primária por esse sistema, a mesma sofre algumas modificações.

2.1.2 Formação da saliva e reflexo salivar

A secreção fluida das glândulas salivares maiores é iniciada em resposta a estimulação dos receptores muscarínicos presentes na superfície das células acinares quando há liberação de acetilcolina liberada pelos terminais nervosos parassimpáticos^{1,2}.

O modelo da secreção fluida pode ser simplificado em dois passos. A primeira parte se dá pela movimentação transepitelial de cloro, que se dirige ao processo de secreção de fluidos e eletrólitos em células acinares. O acúmulo de cloro no lúmen acinar é neutralizado pelo movimento de sódio através das “*tight junctions*” e a água segue osmoticamente. Como a saliva primária transita pela

rede ductal, grande parte do NaCl secretado pelas células acinares é reabsorvido enquanto o potássio é secretado^{1,2}.

O sistema de ducto da glândula salivar modifica a concentração de eletrólitos do fluido secretado final. Desta forma a saliva isotônica se transforma em um fluido hipotônico^{2,12}.

O reflexo salivar nas glândulas salivares maiores é estimulado principalmente pela ativação de receptores gustativos no dorso da língua e por mecanorreceptores presentes no ligamento periodontal. Para a glândula parótida não há influência direta dos receptores olfativos para estimulação da secreção. Esses estímulos geram sinais para as fibras aferentes do nervo glossofaríngeo (ramo timpânico) e as fibras eferentes transmitem o sinal para o gânglio ótico, desta forma o impulso percorre as fibras pós-ganglionares no nervo auriculotemporal até a glândula parótida¹².

2.1.3 Interferência do estresse

O estresse é considerado uma resposta psicofisiológica do organismo ao perigo ou desafio. Uma adaptação individual pode levar à habilidade de dominar o estresse, retornando seu nível para o estado de homeostase¹⁵⁻¹⁷. Uma maneira de manter a homeostase é através da ativação do sistema nervoso simpático, que tem um forte efeito sobre o sistema digestivo, produzindo um efeito direto sobre as glândulas salivares, o que promove uma secreção concentrada, rica em enzimas e mucina. Esse sistema é responsável por liberar alfa-amilase e cortisol, ambos considerados como biomarcadores potenciais, uma vez que a secreção proteica salivar é fortemente dependente desse tipo de ativação¹⁸.

Muitos estudos apontaram correlação do estresse com vários biomarcadores salivares. O nível de cortisol salivar é relacionado com a ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) e uma vez que o estresse mostra o efeito imunossupressor, o nível de IgA e lisozima na saliva tem sido utilizados como um biomarcador objetivo da reação de estresse¹⁶.

A literatura também mostra a possível utilização da cromogranina A (CgA) e da enzima α -amilase como resposta do sistema simpato-adrenomedular ao estresse, ou como biomarcadores alternativos da atividade adrenérgica de

estresse devido a sua estabilidade na saliva e confiabilidade dos valores obtidos¹⁹.

2.2 DESCRIÇÃO DA TÉCNICA EM PROTEÔMICA

Essa etapa será composta por um artigo aceito na Brazilian Oral Research (figura 2.2) com Qualis Capes (Odontologia) – A2. O artigo completo encontra-se no Apêndice A.

Figura 2.2 – Página com a descrição do aceite do artigo na revista Brazilian Oral Research

Manuscripts with Decisions

ACTION	STATUS	ID	TITLE	SUBMITTED	DECISIONED
	ADM: Leitão, Cristina	BOR-2018-0682	Do you know the capacity for diagnosis through saliva analysis? A Review and a guide to Clinical View Submission	17-Sep-2018	05-Nov-2018
	<ul style="list-style-type: none"> Accept (05-Nov-2018) Awaiting Production Checklist 				
	view decision letter				

Fonte: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_serial&pid=1806-8324&lng=en&nrm=iso

2.3 PROTEÍNAS CATALOGADAS NA LITERATURA ENCONTRADAS NA SECREÇÃO DE SALIVA DE DUCTO

Essa parte da revisão de literatura faz parte de uma revisão sistemática (RS) que foi registrada no *International prospective register of systematic reviews* (PROSPERO) sob o número CRD42017074096. Foram selecionados estudos, que realizavam um estudo exploratório de proteínas secretadas em secreções salivares coletadas diretamente de ductos (parótida, submandibular e sublingual), tanto na situação de doença como em pacientes saudáveis.

2.3.1 Critérios de inclusão e exclusão

Os critérios para exclusão dos artigos foram:

- 1- Revisões, editorial, cartas, opiniões pessoais, capítulos de livros e resumos de conferências;
- 2- Estudos experimentais: in vitro ou in vivo (animais);
- 3- Proteínas do sangue (soro) e outras proteínas que não são de fonte de saliva;
- 4- Estudos com saliva total

Já os critérios de inclusão foram: estudos que analisaram saliva coletada de ductos de pacientes saudáveis ou de qualquer doença, em qualquer faixa etária ou sexo. Não houve restrição de horário ou idioma.

2.3.2 Seleção dos estudos

Para se realizar essa revisão, dois revisores (CVE e WGC) completaram de forma independente em diversas bases utilizando o seguinte termo de busca :

((("Proteomics" OR "Proteomic analyze" OR Proteomics OR "Mass spectrometry" OR "SDS gel" OR Proteome OR "Mass Spectrometry" OR "Mass Spectroscopy" OR "Mass Spectrum Analyses" OR "Mass Spectrum Analysis" OR "Spectrometry, Mass, Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization" OR "Mass Spectrometry, Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization" OR "Mass Spectrometry, Matrix Assisted Laser Desorption Ionization" OR "Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization Mass Spectrometry" OR "Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry" OR MALDI OR "Spectroscopy, Mass, Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization" OR MS-MALD OR MALD-MS OR MALDI-MS OR "MALDI MS" OR "Laser Desorption-Ionization Mass Spectrometry, Matrix-Assisted" OR "Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry, Matrix Assisted" OR "Mass Spectroscopy, Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization" OR "Mass Spectroscopy, Matrix Assisted Laser Desorption Ionization" OR "Surface Enhanced Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry" OR SELDI-TOF-MS OR "Electrophoresis, Polyacrylamide Gel" OR "Polyacrylamide Gel Electrophoresis" OR SDS-PAGE OR "SDS PAGE" OR "Sodium Dodecyl Sulfate-PAGE" OR "Sodium Dodecyl Sulfate PAGE" OR

"Sodium Dodecyl Sulfate-PAGEs")) AND (("Salivary Glands" OR "Salivary gland" OR "Parotid Gland" OR "Parotid Glands" OR "Salivary Ducts" OR "Salivary Duct" OR "ductal secretion" OR "Sublingual Gland" OR "Sublingual Glands" OR "Submandibular Gland" OR "Submandibular Glands" OR "Submaxillary Gland" OR "Submaxillary Glands"))).

Na fase dois, os mesmos autores revisaram os artigos selecionados de acordo com os critérios de inclusão e exclusão. Para se resolver as discrepâncias um terceiro autor (CALJ) foi convocado.

Foram encontrados na busca inicial 3676 artigos, sendo estes encontrados nas seguintes bases: 1563 artigos no PubMed, 1581 na EMBASE, 510 Na Web of Sciences e 22 na Scopus. Destes foram selecionados 120 artigos, que após a remoção dos duplicados com a ajuda do editor Mendely ficaram em 84 artigos foram incluídos para serem lidos na integra.

Do total, 12 artigos foram excluídos por serem de revisão, 2 foram excluídos por analisarem o tecido glandular, 3 foram excluídos por realizar a análise em saliva animal, 1 foi excluído por comparar a saliva total com o plasma, 4 por utilizarem apenas as técnicas em proteômica sem a análise por espectrometria de massas e 52 foram excluídos por realizarem a análise apenas na saliva total. Os 10 artigos incluídos no estudo estão sumarizados na tabela 2.1. As proteínas encontradas nesses artigos estão no Apêndice B.

Os dados referentes à discussão, encontram-se no item Discussão desta Tese.

Tabela 2.1 – Resumos dos artigos incluídos na revisão

	Hardt et al. 2005²⁰	Hardt et al.2005²¹	Ryu et al.2006²²	Neyraud et al.2006²³	Denny et al.2008²⁴	D.Preza et al. 2009²⁵	S. Wu et al.2014²⁶
Método	Liquid chromatographic MALDI TOF MS MALDI TOF/TOF MS/MS	2 D SDS-PAGE MALDI TOF MS oMALDI QqTOF MS/MS MALDI TOF/TOF MS/MS	2D SDS-PAGE 2D-DIGE SELDI-TOF-MS MALDI-TOF-MS	2D SDS-PAGE MALDI TOF	*	SDS-PAGE LC-MS/MS	LC-MS/MS Developed a top down (AMT)
Pacientes	1 homem saudável	3 (2 homens and 1 mulher) saudáveis	41 SS primária	4 pacientes saudáveis	*	41 idosos (5 homens e 36 mulheres) 10 jovens (1 masculino e 9 femininos)	Sem informação
Idade	30 anos	30, 24 e 22 anos	Sem informação	Sem informação	*	82-98 anos 30-39 anos	22-30 anos
Controle	-	-	20 pacientes pareados por sexo e idade	-	-	21 idosos sem RC 10 jovens	-
Doença estudada	Monitorar as alterações diurnas da saliva da parótida humana - efeitos do ritmo circadiano	Catalogar as proteínas da parótida	SS primária	Proteoma salivar após estimulação por diferentes sabores	Catálogo de proteínas salivares humanas	Compare idosos com e sem RC	Abordagem para quantificar o proteoforma
Amostras	Parótida	Parótida	Parótida	Saliva total e parótida	Parótida/ Submandibular / Sublingual	Parótida	Parótida/ Submandibular / Sublingual
Tempo de coleta	4 tempos distintos (9 a.m., 12 p.m., 3 p.m., 6 p.m.)	Sem informação	Entre 9 e 11 a.m. – Depois de 2 min de estimulação, coletada por 1min	De manhã e à tarde	*	De manhã	Sem informação
Estimulação da saliva	Sem informação	Sem informação	2% de ácido cítrico a cada 30 min	Amargo	*	Pedaco de doce de limão azedo	Solução aquosa de ácido cítrico (2%)
Proteínas detectadas	-	80 spots in 2DE	8 spots como possível biomarcador	-	*	73 proteínas (46 estavam presentes em todos os grupos, 9 eram exclusivas do RC)	83 proteínas da saliva humana

Continua

Conclusão

	Laheij et al. 2015²⁷	Jasim et al. 2016²⁸	Hall et al. 2017²⁹
Método	SELDI-TOF-MS	2-DE	Análise de Espectrometria de Massa do Péptido Marcado pelo iTRAQ
Pacientes	9 pacientes (5 mulheres, 4 homens) 10 pacientes saudáveis (7 homens e 3 mulheres)	10 pacientes (5 homens e 5 mulheres)	15 pacientes com SS
Idade	Média de idade de 60,7 anos Idade média 39,8 anos	Idade média 23,6 anos	Sem informação
Controle	10 pacientes saudáveis	-	15 controles saudáveis
Doença estudada	Proteínas parotídeas salivares em pacientes irradiados	Perfil de saliva proteômica em indivíduos saudáveis sem dor	SS primária
Amostras	Parótida	Saliva total Parótida e Submandibular (não estimulado e estimulado)	Saliva total (WS) e de Parótida (PS)
Tempo de coleta	Sem informação	Entre as 8:30 e as 10:30	Sem informação
Estimulação da saliva	Solução de ácido cítrico a 4% para a borda lateral da língua	Parafina de goma 2% de ácido cítrico	Sem informação
Proteínas detectadas	65 proteínas	213 spots de proteínas	WS (345 proteínas) e PS (230 proteínas)

Fonte: elaborado pela autora.

Legenda: QqTOF: quadrupole/quadruple/time-of-flight mass spectrometer; 2D-DIGE: Two-dimensional differential gel electrophoresis; SS: Sjögren's Syndrome; RC: root caries; AMT: accurate mass and time (continua)

3 PROPOSIÇÃO

O presente estudo tem como objetivo principal ser o primeiro passo na identificação da composição proteica e / ou peptídica da saliva da glândula parótida em indivíduos saudáveis, para futuramente servir como base nos estudos, que investigam biomarcadores nos processos de doença, através dos seguintes itens:

1) Realizar um compendio quantitativo e qualitativo de todas as proteínas expressas na glândula parótida sob fluxo contínuo (a glândula parótida foi treinada para secretar 1 ml / min e 0,25 ml / min) por um período de 30 minutos;

2) Avaliar se há diferenças quantitativas e qualitativas das proteínas expressas na glândula parótica quando avaliadas individualmente ou em *pool* salivar;

3) Avaliar se há mudanças na composição proteica da glândula parótida sob fluxo contínuo (1 ml/min) em situação de estresse, quando correlacionado com a situação de normalidade.

4 CASUÍSTICA-MATERIAL E MÉTODOS

Sessão será abordado os aspectos éticos, casuística e a metodologia utilizada nesse estudo.

4.1 ASPECTOS ÉTICOS

O protocolo deste estudo foi submetido e devidamente aprovado pelos seguintes comitês de ética: Comitê de ética em Pesquisa com Seres Humanos da FOU SP (1556125) (Anexo A), pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (1928531) (Anexo B) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Ciências da Saúde envolvendo Seres Humanos da University of Western Ontario (6251) (Anexo C). Os voluntários participaram após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido -TCLE.

4.2 DESENHO DO ESTUDO E PARTICIPANTES DA PESQUISA

Este estudo teve o desenho observacional, transversal, selecionando 6 voluntários com idade de 28 a 40 anos, de ambos os gêneros (4 mulheres e 2 homens), com bom estado de saúde bucal e sem doenças sistêmicas.

4.2.1 Critérios de Inclusão

Para o paciente ser considerado saudável, era necessário cumprir os seguintes critérios de inclusão listados no quadro 4.1:

Quadro 4.1- Critérios de inclusão

Critério de Inclusão de pacientes saudáveis
Não utilizar nenhuma medicação sistêmica
Índice de massa corporal $\leq 24.9 \text{ kg/m}^2$
Sem queixas xerostomia ou hipossalivação
Ter todos os dentes permanentes (28 elementos)
Sem sinais de gengivite ou periodontite
Ser livre de lesões cariosas
Sem lesões na mucosa oral, como por exemplo, úlceras

Fonte: elaborado pela autora.

4.2.2 Critérios de Exclusão

O paciente foi excluído da pesquisa quando possuía ao menos um dos seguintes critérios de exclusão (quadro 4.2):

Quadro 4.2- Critérios de exclusão

Critério de Exclusão
Utilização de medicação sistêmica
Índice de massa corporal $\leq 17.9 \text{ kg/m}^2$ ou $\geq 25 \text{ kg/m}^2$
Possuir a Doença do Refluxo gastroesofágico diagnosticado ou sintomas compatíveis com a doença
Não assinar o TCLE

Fonte: elaborado pela autora.

4.2.3 Exame Clínico

Todos os pacientes foram avaliados pelo mesmo examinador (LM) para verificar a presença de lesões cariosas, lesões em tecidos moles ou

sangramento gengival, que pudessem interferir no padrão de normalidade exigido nesse estudo.

4.3 COLETA SALIVAR

Realizou-se a coleta salivar diretamente do ducto da glândula parótida, com o auxílio da *Lasheley cup*, que foi facilmente adaptada a papila do ducto parotídeo, evitando contaminações (Figura 4.1). Os pacientes foram instruídos a ficarem por 2 horas sem se alimentarem ou ingerirem líquidos, assim como realizarem higiene oral, previamente a coleta.

Todas as coletas foram realizadas pelo período da manhã (às 10:00 h), durante 30 minutos sob fluxo contínuo, para diminuir interferências do ritmo circadiano e em triplicata (3 diferentes dias, com intervalo de 1 semana cada durante as estações da primavera/verão).

4.3.1 Manutenção do fluxo contínuo

O fluxo contínuo foi mantido por cada indivíduo constante através da técnica de *feed-back* negativo descrita por Dawes³⁰. O estímulo gustativo foi realizado com *Sour Lemon Drops* (S.L.D) sem adição de açúcar e os voluntários posicionados em frente aos 30 tubos de microcentrifuga (Axygen, Union City, CA, USA) de 1,5 ml. O voluntário foi capaz de calcular a taxa de fluxo, com a ajuda de um cronômetro para regular os graus de sucção do S.L.D, desta forma mantendo o fluxo constante em duas diferentes vazões ($\pm 1,0$ ml/min e $\pm 0,25$ ml/min) durante o período consecutivo de 30 minutos (Figura 4.1).

Durante a fase de treinamento, todas as coleções foram realizadas de acordo com o item 4.3 sob refrigeração (dentro de um isopor com gelo-temperatura de 4°C) até que o fluxo foi mantido constante e as coleções para o estudo realizadas. Apenas dois indivíduos conseguiram manter o fluxo contínuo de 0,25 ml/min durante o período consecutivo de 30 minutos.

Imediatamente após a coleta e mantida sobre refrigeração a amostra foi centrifugada a 20.000 rpm por 20 min a 4°C para remoção de material insolúvel, debris celulares. O sobrenadante foi recolhido e transferido para microtubos

(Axygen, Union City, CA, USA) e armazenado a -80°C e posteriormente liofilizadas.

4.3.2 Manutenção do fluxo contínuo em situação de estresse

O nível de ansiedade foi medido através do questionário “O Inventário de Ansiedade Traço-Estado (IDATE)” proposto por Spielberg et al³¹. O questionário é composto por duas escalas distintas: uma relacionada à ansiedade-estado (IDATE-S) e outra relacionada à ansiedade-traço (IDATE-T). Cada um é composto por 20 itens que avaliam a ansiedade, com todos os itens sendo classificados em uma escala de 4 pontos. Em nosso estudo, o Inventário de Ansiedade do Estado do Inventário de Ansiedade Transiente do Estado / Traço (Inventário de Ansiedade Traço de Estado - STAI) foi usado porque foi projetado para medir os sentimentos atuais.

Todos os participantes deste estudo foram orientados a marcar uma das opções do questionário “nunca”, “às vezes”, “frequentemente” ou “quase sempre”, para cada item da pesquisa. Os escores variam de 20 a 80, com escores mais altos correlacionados com maior ansiedade. Para ser considerado com nível baixo, moderado e alto de ansiedade, a pontuação do IDATE do paciente deve estar dentro dos seguintes valores: 20 a 37, 38 a 44 e 45 a 80, respectivamente.

O fluxo contínuo em situação de estresse foi também mantido por cada indivíduo constante através da técnica de *feed-back* negativo descrita por Dawes³⁰ e detalhadamente explicada no item 4.3.1.

Para esse passo, foram selecionados da amostra dois indivíduos do sexo feminino, normotensos, com idade semelhantes (28 e 30 anos respectivamente), que foram instruídos a coletar saliva da glândula parótida por um período de 10 minutos sob fluxo contínuo (1mL/min) e 2 minutos de saliva de parótida sem estímulo.

A coleta foi realizada em dois momentos distintos, sendo a primeira coleta 1 hora antes do estímulo estressante (exame de qualificação do Doutorado) e 1 semana após o estímulo estressante.

Como as demais coletas, a coleta em situação de estresse foi realizada pelo período da manhã (às 10:00 h), durante 12 minutos (os 2 primeiros minutos

da coleta foram de saliva não estimulada e os 10 minutos restantes sob fluxo contínuo) para diminuir interferências do ritmo circadiano (Figura 4.1).

Imediatamente após a coleta e mantida sobre refrigeração a amostra foi centrifugada a 20.000 rpm por 20 min a 4°C, para remoção de material insolúvel, debris celulares. O sobrenadante foi recolhido e transferido para microtubos (Axygen, Union City, CA, USA) e armazenado a -80°C.

Figura 4.1 – Esquema detalhado da coleta salivar diretamente do ducto da glândula parótida. O mesmo esquema foi utilizado para ilustração dos seguintes itens: 4.3, 4.3.1 e 4.3.2.

Esquema da coleta salivar da parótida: Os indivíduos foram devidamente treinados a manter o fluxo contínuo (1ml/min, 0,25 ml/min) com “sour drops” sem adição de açúcar durante 30 minutos e de 10 minutos na situação de estresse.

Fonte: Eisbruch ³².

4.4 DESENVOLVIMENTO DOS PARÂMETROS DOS EXPERIMENTOS LABORATORIAIS E CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS COLETADAS

Nesse tópico será abordado os parâmetros laboratoriais.

4.4.1 Concentração de proteína total

As amostras do sobrenadante (25 µl de cada tempo de coleta) 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), seguindo as instruções do fabricante. Essa análise foi realizada a partir de nove concentrações de solução padrão de albumina sérica bovina com crescentes concentrações pré- estabelecidas (0 a 2000 µg/mL) e adicionadas em duplicatas ao reagente do BCA (200 µl de Working reagente - WR) e reservadas durante trinta minutos a 37°C. Após esse período foi construída uma curva de calibração ao lado das amostras de saliva a serem estudadas.

A absorbância foi 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) (Figura 4.2). Nesse programa foi construída uma curva de calibração a partir do coeficiente de determinação R^2 e da equação de primeiro grau correspondente de cada um das médias dos valores encontrados de absorbância de cada uma das concentrações da solução padrão. O critério adotado para a validação da análise foi o valor do coeficiente de determinação (R^2) dessa curva acima de 0,99 e a equação de primeiro grau foi utilizada para se calcular a concentração proteica de cada amostra. Os dados foram analisados estatisticamente pela análise de variância (Figura 4.2).

Após a obtenção dos resultados, alíquotas contendo 20 µg de proteínas salivares serão preparadas em novos microtubos e desidratadas em evaporador rotativo (Vacufuge Plus, Eppendorf, Hamburg, Germany) e serão mantidas a - 20°C até o uso nos experimentos posteriores.

Figura 4.2 – Esquema detalhado do método colorimétrico de reação com ácido bicinonínico (BCA)

Fonte: SMART - Servier Medical ART³³

4.4.2 Determinação da quantidade de proteínas salivares e caracterização do perfil proteico por Eletroforese 1D SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate – Polyacrylamide Gel Electrophoresis*)

Este experimento foi realizado em duas diferentes etapas:

1. Na primeira etapa, após a aferição das concentrações de proteína total, alíquotas contendo 20µg de saliva de 3 participantes – Pool salivar de todos tempos (T1 até T30) e pool de cada tempo individual de cada participante, foram preparadas.
2. Já na segunda etapa, alíquotas individuais de 20µg de 2 participantes - Pool e amostras individuais de todos os tempos (T1 até T30) de cada participante foram preparadas. As alíquotas foram desidratadas em evaporador rotativo e conservadas em congelador a -20°C até o momento do experimento.

As amostras foram suspendidas com 20µL de uma solução-tampão (dodecil sulfato de sódio (SDS) 2%, ditioneíto (DTT) a 165 mM, glicerol a 20%, tris (hidroximetil) aminometano a 20 mM ajustado a pH 6,8 com ácido hidrocloreídrico (Tris-Cl), ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) a 2mM, azul de bromofenol a 0,1 mg/mL e 5mM de beta-marcaptoenol (BME) e em seguida mantidas a 100°C (em fervura) durante cinco minutos.

Na sequência após o resfriamento (temperatura ambiente), cada ressuspensão foi carregada em um poço de gel de poliacrilamida a 12% (gel de separação) misturado a um gel de carregamento de 4%, contendo dodecil-sulfato de sódio, montado em um conjunto de minigel de eletroforese Mini-Protean (Bio-Rad Inc., Hercules, EUA). O primeiro poço de cada gel era carregado com 5µL de Precision Plus All Blue (Bio-Rad Inc., Hercules, EUA) para servir como padrão de referência.

O processo de eletroforese seguiu o método de Laemmli, que teve como parâmetro a temperatura ambiente de 22°C e corrente de 100V durante o período de 2 horas. Após as proteínas alcançarem a parte inferior do gel (aproximadamente 0,5 cm para o final do gel) a corrente elétrica foi desligada e as placas de vidro do minigel separadas (Figura 4.3).

O gel das placas foi retirado e corado, utilizando uma solução aquosa específica para géis SDS-PAGE contendo o azul de Coomassie G250 a 0,2%, metanol a 40% e ácido acético a 10%, a temperatura ambiente por um período de 2 horas. A etapa de descoloração usou uma solução aquosa de metanol a 40% e ácido acético 10%, por aproximadamente 16 horas ou até que o gel estivesse suficientemente descolorido, sendo mantida em seguida em água ultrapura (Figura 4.3).

Figura 4.3 – Esquema detalhado do processo de eletroforese 1D seguindo o método de Laemmli

Fonte: SMART - Servier Medical ART³³

As imagens do gel foram obtidas usando o digitalizador Bio-Rad ChemiDrop MP (Bio-Rad Inc., Hercules, EUA), sendo exportadas em formato JPG.

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

4.4.3 Análise e determinação de Histatinas salivares através da eletroforese com gel nativo catiônico

Para a realização da eletroforese com gel nativo catiônico foram utilizadas as alíquotas de 20µg preparadas no item 4.4.2. Essa técnica é realizada em um gel específico, preparado em duas fases:

- 1) O gel de carregamento e o de separação possuem concentrações diferentes de poliacrilamida e polimerizados por luz incandescente de 120V, com potência de 100W e 60W respectivamente
- 2) Os géis foram montados no conjunto minigel de eletroforese Mini Protean (Bio-Rad Inc., Hercules, CA, EUA) e carregados com as proteínas salivares ressuspendidas com uma solução tampão aquosa contendo 4g de sacarose, 4mg verde metil, com volume final de 10 mL. Neste método as proteínas ressuspendidas não necessitaram ser mantidas a temperatura de 100°C (em fervura), sendo carregadas diretamente no gel de eletroforese após a ressuspensão. Como padrão de ressuspensão será preparado uma amostra com 4µg de cada histatina (1, 3 e 5) em 20µL da solução tampão.

A técnica da eletroforese com gel nativo catiônico foi realizada para que as proteínas catiônicas fossem atraídas do anodo localizado na parte superior para o catodo localizado na parte inferior do gel, utilizando a voltagem de 100 V por um tempo de aproximadamente 2 horas e 30 min. As amostras suspendidas foram carregadas nos géis em poços contíguos.

Quando foi observado que as proteínas alcançaram 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 1 hora em uma solução aquosa específica para gel cativo 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 fiquem nítidas. Os géis foram conservados em água ultrapura até a realização do registro das imagens.

As imagens do gel foram obtidas usando o digitalizador Bio-Rad ChemiDrop MP (Bio-Rad Inc., Hercules, EUA), conectado a um computador

contendo o programa Image Lab 6.0.1 (Bio-Rad Inc., Hercules, EUA). As bandas estudadas foram selecionadas com as ferramentas contidas neste programa e as 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 analisados estatisticamente através da análise de variância com valor de significância p menos do que 0,05. Para as demais análises estatísticas descritas, utilizou-se o programa Bioestat versão 5.3.

4.4.4 Preparação das amostras para a espectrometria de massa dos géis 1D SDS-PAGE

As imagens do gel foram obtidas usando o digitalizador Bio-Rad ChemiDrop MP (Bio-Rad Inc., Hercules, EUA), conectado a um computador contendo o programa Image Lab 6.0.1 (Bio-Rad Inc., Hercules, EUA). As bandas estudadas foram selecionadas com as ferramentas contidas neste programa e as bandas mais intensas foram selecionadas.

Após a separação das bandas de proteína do gel, os pedaços foram recortados com a lâmina de bisturi cirúrgico 15 (Medblade Ltda., Manaus, Brasil) em fragmentos de 1 a 2 mm e colocados em tubos de microcentrifuga de 1,7 ml. Em seguida, o corante azul de Coomassie contido no gel foi removido com a adição de uma solução preparada com bicarbonato de amônio 25mM e acetonitrila a 50% por 30 minutos. Para se realizar a digestão do gel, foi adicionado acetonitrila pura durante 15 minutos, a fim de se realizar a contração do mesmo para melhor absorção das soluções subsequentes: 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. Os géis foram mantidos em contato com essa solução por um período de 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 (proteínas digeridas) foi transferida para um novo tubo. Esse líquido foi submetido à secagem com evaporador rotativo e os sais foram removidos em colunas de micro colunas de fase reversa (C-18 Zip-Tips®, Milipore, Billerica, EUA) para posteriormente ser submetido a análise por espectrometria de massa.

4.5 ANÁLISE POR ESPECTROMETRIA DE MASSA E IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS

O equipamento utilizado para se realizar a espectrometria de massa foi o LTQ-Orbitrap Velos (Thermo Scientific, San Jose, EUA). Esse equipamento possui uma fase de cromatografia líquida com uma coluna de 100mm 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 electrospray do equipamento possui uma 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 preparadas no item 4.4.4 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 posteriormente foram inseridas no equipamento. A fase de cromatografia líquida foi desenvolvida durante 85 minutos, por um gradiente de 0 a 100% do solvente B (acetonitrila a 97,5% e ácido fórmico a 0,1%), com fluxo de 200 nL/min e pressão máxima de 280 bar. Parâmetros de voltagem do electrospray e temperatura do capilar de transferência iônica foram de 1,8 kV e 250 °C.

Os espectros medidos pelo equipamento foram confrontados com valores de outros estudos em um 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 Prot and TrEMBL, Swiss Institute of Bioinformatics, Geneva, Switzerland, <http://ca.expasy.org/sprot>) no software Proteome Discover 1.3 (Thermo Scientific, San Jose, EUA).

Para a análise de dados, os resultados de busca foram filtrados e incluíram uma taxa de falsa descoberta de 1%. Foram permitidas 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 avaliadas e as diferentes formas de queratina encontradas foram eliminadas por serem consideradas possíveis contaminantes

4.6 CLASSIFICAÇÃO FUNCIONAL DO PROTEOMA SALIVAR DA GLÂNDULA PARÓTIDA E ANÁLISE DENSITOMÉTRICA QUANTITATIVA

Os arquivos resultantes contendo as listas das proteínas identificadas foram comparadas construindo-se diagramas de Venn (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>), para identificar as proteínas em comum e as de variação individual encontradas nas amostras de saliva dos participantes.

As proteínas encontradas foram todas sequenciadas e verificadas de acordo com sua função no banco de dados - The Universal Protein Resource – UniProt (<https://www.uniprot.org>).

Para se saber o valor densitométrico relativo de variação das bandas de proteína durante a separação eletroforética, em estímulo contínuo e em situação de estresse, as imagens do gel (1D SDS-PAGE e Catiônico) foram obtidas a partir digitalizador Bio-Rad ChemiDrop MP (Bio-Rad Inc., Hercules, EUA), e analisadas pelo programa Image Lab 6.0.1 (Bio-Rad Inc., Hercules, EUA) através do cálculo da relação dos volumes das intensidades ajustado pelo valor de fundo do gel de eletroforese.

Os valores foram analisados estatisticamente através da análise de variância com valor de significância p menos do que 0,05. Para as demais análises estatísticas descritas, utilizou-se o programa Bioestat 5.3.

5 RESULTADOS

Essa sessão será destinada aos resultados encontrados.

5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS PARTICIPANTES

O grupo final foi composto por 5 participantes totalmente saudáveis, sendo 3 do sexo feminino e 2 do sexo masculino. Com idade média de 31, 6 anos, variando de 28- 40 anos. Uma participante foi excluída, devido à ingestão de uma dieta altamente proteica, que interferiu no resultado do valor de proteína total.

5.2 COLETA SALIVAR

Essa sessão destinada aos resultados referentes a coleta salivar.

5.2.1 Manutenção do fluxo contínuo

A análise descritiva da manutenção do fluxo contínuo em cada uma das 3 coletas realizada por todos os participantes está descrita na tabela 5.1. Para o fluxo contínuo com volume de 0,25 ml/min, apenas dois indivíduos conseguiram a manutenção do fluxo contínuo durante o período de 30 minutos.

Tabela 5.1 – Análise descritiva da coleta salivar com fluxo contínuo de 1 ml/min durante o período de estimulação de 30 minutos. Na segunda parte da tabela observamos a manutenção do fluxo contínuo com volume de 0,25 ml/min, conseguido pelos indivíduos número 1 e 2

Indivíduo	1ª coleta	2ª coleta	3ª coleta
1	Média 1,05	Média 1,004	Média 1,04
	SD 0,07	SD 0,04	SD 0,06
	Mediana 1	Mediana 1	Mediana 1
2	Média 1,00	Média 1,00	Média 1,02
	SD 0,07	SD 0,05	SD 0,02
	Mediana 1	Mediana 1	Mediana 1
3	Média 1,00	Média 1,00	Média 1,00
	SD 0,02	SD 0,02	SD 0,03
	Mediana 1	Mediana 1	Mediana 1
4	Média 0,96	Média 1,00	Média 1,00
	SD 0,11	SD 0,04	SD 0,10
	Mediana 1	Mediana 1	Mediana 1
5	Média 1,02	Média 0,98	Média 1,00
	SD 0,11	SD 0,06	SD 0,08
	Mediana 1	Mediana 1	Mediana 1
6*	Média 0,98	Média 0,99	Média 0,99
	SD 0,08	SD 0,08	SD 0,08
	Mediana 1	Mediana 1	Mediana 1
Indivíduo	1ª coleta	2ª coleta	3ª coleta
1	Média 0,26	Média 0,26	Média 0,25
	SD 0,03	SD 0,02	SD 0,02
	Mediana 0,25	Mediana 0,25	Mediana 0,25
2	Média 0,26	Média 0,26	Média 0,25
	SD 0,017	SD 0,014	SD 0,01
	Mediana 0,25	Mediana 0,25	Mediana 0,25

Fonte: elaborada pela autora

Legenda: * Indivíduo 6 excluído

Através da análise descritiva, podemos observar que todos os participantes conseguiram a manutenção do fluxo contínuo, com média variando de 1,02 até 0,96 e desvio padrão variando de 0,02 a 0,11, quando observamos o fluxo no volume de 1 ml/min. Já no volume de 0,25 ml/min os valores foram

mais constantes com média variando de 0,25 até 0,26 e desvio padrão variando de 0,017 até 0,03.

5.2.2 Manutenção do fluxo contínuo em situação de estresse

A análise descritiva da manutenção do fluxo contínuo de 1ml/min em situação de estresse realizada pelos indivíduos 4 e 5 está descrita na tabela 5.2. As coletas foram realizadas com o intervalo de 1 semana. Para a realização dessa etapa, foram escolhidas duas participantes do sexo feminino, com idade média de 30 anos (28-32). A caracterização da amostra segundo o inventário de Ansiedade Traço-Estado (IDATE) teve como resultado 100% dos indivíduos com alta ansiedade, o que confirmou a situação de estresse.

Tabela 5.2 – Análise descritiva da coleta salivar com fluxo contínuo de 1 ml/min durante o período de estimulação de 30 minutos durante o período de estresse e após a situação de estresse

Indivíduo	Estresse	Após situação de estresse
4	Média 1,02	Média 0,98
	SD 0,07	SD 0,06
	Mediana 1	Mediana 1
5	Média 0,96	Média 1,01
	SD 0,11	SD 0,11
	Mediana 1	Mediana 1

Fonte: elaborada pela autora

5.3 DESENVOLVIMENTO DOS PARÂMETROS DOS EXPERIMENTOS LABORATORIAIS

Parte destinada aos parâmetros laboratoriais

5.3.1 Concentração de proteína total

Os gráficos mostrados na figura 5.1 mostram o aperfeiçoamento na calibração de pipetagem, a partir da concentração de proteína total em razão da absorbância na construção da curva de calibração dos padrões de albumina sérica bovina, construídos a partir do mesmo lote de albumina, com o valor R^2 usado em todos os experimentos de 0,99, indicando alto padrão de correlação linear.

Figura 5.1 – Construção da curva de calibração dos padrões de albumina sérica bovina a partir da concentração de proteína total em razão da absorbância

Fonte: elaborada pela autora

A partir da equação mostrada na figura 5.1, com o coeficiente de $R^2 = 0,99$, foi mensurada a concentração de proteína total das amostras de saliva mensuradas pelo método colorimétrico de reação com ácido bicinconínico (BCA).

No gráfico 5.1 e na Tabela 5.3 com a análise descritiva, vemos a média da concentração de proteínas das três coletas de saliva (1ml/min) de todos os indivíduos. Quando analisamos o gráfico, os resultados são semelhantes aos encontrados por Colin Dawes^{30,34,35} com a concentração de proteína diminuindo inicialmente com ascensão nos tempos posteriores.

Outro dado importante é o fato da concentração de proteínas ser também semelhante ao encontrado no estudo de Colin Dawes³⁵, quando o estímulo

gustativo, ocorreu com gotas de limão azedo. Em nosso estudo, o estímulo gustativo foi realizado por balas sem açúcar e com sabor azedo de limão, o que demonstra o fator estímulo gustativo como possível influenciador no padrão secreção proteica.

Desta forma, o participante número 6, mesmo com o estímulo gustativo semelhante aos demais, demonstrou um padrão diferente de secreção proteica quando comparado aos demais participantes, uma possível explicação pode ser devido à ingesta de uma dieta com alto consumo de proteínas, o que inviabilizou demais análises do participante, desta forma, o indivíduo foi excluído da amostra final.

Gráfico 5.1 - Média da concentração de proteína total das três coletas de saliva (1ml/min) de todos os indivíduos

Fonte: elaborado pela autora.

Tabela 5.3 – Análise descritiva da média da concentração de proteínas das três coletas de saliva (1ml/min) de todos os indivíduos. Todos os valores são em µg/ml

	1	2	3	4	5	6
Mínimo	839	776	822	813	853	1034
Máximo	1687	1670	1670	1676	1643	1921
Mediana	1220	1135,5	1181	1173	957,5	1742,5
Média	1257,73	1188,9	1228,5	1225,2	986	1651,3
aritmética						
Desvio	231,7	243,9	234,1	236,1	135,2	246,9
padrão						

Fonte: elaborada pela autora

Para se saber se as amostras dos 6 participantes seguiam estatisticamente o mesmo padrão de secreção proteica, foi realizado o teste de correlação de Kruskal-Wallis com correção de Dunn, que permitiu a avaliação comparativa das concentrações entre os indivíduos. Essa comparação resultou em um valor de significância estatística ($p < 0,001$), com pelo menos dois indivíduos possuindo função de distribuição de secreção de proteínas diferentes. Os resultados obtidos na análise comparativa entre os indivíduos e que mostraram valores estatisticamente significante ($p < 0,05$) na diferença de concentração dos valores proteicos pode ser observado no gráfico 5.2.

Gráfico 5.2 – Diferença entre as médias dos postos a partir do teste de Kruskal-Wallis (análise comparativa das concentrações)

Fonte: elaborado pela autora.

Legenda: * Análises com diferença estatisticamente significante ($p < 0,05$)

A partir do gráfico 5.1, foi observado que o indivíduo 5S tem um padrão de secreção geral semelhante aos demais participantes, com diferença em T4 e T5, os quais foram encontrados acréscimo de proteínas ao invés do decréscimo e em T17 e T27, os quais foram encontrados decréscimo de proteínas ao invés de acréscimo encontrado nos demais participantes.

Desta forma, foi construído um gráfico (gráfico 5.3) com apenas os indivíduos 1S, 2S, 3S e 4 S, para se observar apenas o padrão de secreção proteica destes indivíduos, que coincidentemente possuem o mesmo tipo de gráfico.

Gráfico 5.3 – Média da concentração de proteína total das três coletas de saliva (1ml/min) dos indivíduos de 1 a 4

Fonte: elaborado pela autora.

Para se verificar se as amostras dos 4 participantes, além de terem o mesmo padrão gráfico seguiam estatisticamente o mesmo padrão de secreção proteica foi realizado o teste de correlação de Kruskal-Wallis ($p=0,59$). Essa comparação não resultou em valor de significância estatística, indicando que os indivíduos possuem o mesmo padrão de secreção proteica. Os resultados obtidos na análise comparativa entre os indivíduos podem ser observados no gráfico 5.4, o qual todos os valores foram não significativos.

Gráfico 5.4 – Diferença entre as médias dos postos a partir do teste de Kruskal-Wallis (análise comparativa das concentrações)

Fonte: elaborado pela autora.

Para se verificar o padrão de secreção proteica do volume constante em 0,25 ml/min, também foi construído um gráfico (gráfico 5.5) para os indivíduos 1 e 2.

Gráfico 5.5– Média da concentração de proteína total das três coletas de saliva (0,25ml/min) dos indivíduos de 1 e 2

Fonte: elaborado pela autora.

De acordo com o gráfico 5.5, podemos observar que o padrão de secreção proteica no volume constante de 0,25 ml/min foi diferente quando comparado ao gráfico 5.1. A média da concentração proteica foi maior e o gráfico teve menos picos, sendo a concentração proteica mais constante nesse fluxo.

Foi realizado o teste de comparações das medianas de Mann-Whitney com valor estatisticamente significativo ($p < 0,001$), o que configurou que os participantes conseguiram manter o padrão de secreção proteica no volume constante de 0,25 ml/min (tabela 5.4 e gráfico 5.6).

Tabela 5.4 – Análise descritiva da média da concentração de proteínas das três coletas de saliva (0,25 ml/min) dos indivíduos 1 e 2. Todos os valores são em µg/ml

	1	2
Mínimo	781	1399
Máximo	1187	2347
Mediana	961	1553,5
Média aritmética	963,4	1595
Desvio padrão	120,07	202,4

Fonte: elaborado pela autora.

Gráfico 5.6 – Comparação das medianas em relação a concentração de proteína total dos indivíduos 1 e 2 ($p < 0,001$)

Fonte: elaborado pela autora.

5.3.1.1 Concentração proteica sob estresse

A concentração total de proteínas variou significativamente de acordo com o participante e a situação de estresse (gráfico 5.7). Curiosamente, a coleta sob situação de estresse apresentou a variação da concentração de proteína total marcadamente elevada em T1 em ambos os indivíduos, com a menor concentração de proteína total em T6. A análise descritiva dos dados de acordo com a situação está descrita na tabela 5.5.

Gráfico 5.7 - Concentração de proteína em função do tempo. Secreção da parótida antes (A/B) e após (A st/B st) o período de estresse

Fonte: elaborado pela autora..

Legenda: (A) indivíduo A sob estresse; (B) indivíduo B sob estresse; (Ast) indivíduo A após a situação de estresse; (Bst) indivíduo B após a situação de estresse

Tabela 5.5 – Análise descritiva dos dados de acordo com a situação. Todos os valores são em µg/ml

	A	AST	B	BST
Mínimo	417	481	614	813
Máximo	1351	715	1771	1306
Mediana	494	552	754	1018,5
Média aritmética	596,16	572,25	847,96	1015,25
Desvio padrão	273,07	76,52	313,33	140,74

Fonte: elaborado pela autora..

Legenda: (A) indivíduo A sob estresse; (B) indivíduo B sob estresse; (Ast) indivíduo A após a situação de estresse; (Bst) indivíduo B após a situação de estresse

Para avaliar a variação intraindividual entre a situação de estresse e de não estresse, entre os indivíduos A e B, foi utilizado o Teste de Wilcoxon para comparar as amostras correlacionadas (indivíduo A, $p=0,21$ e indivíduo B, $p=0,001$). Essa comparação se mostrou apenas significativa para o indivíduo B, demonstrando que houve diferenças significativas entre as duas situações apenas no indivíduo A.

Já para a variação interindividual, entre a situação de estresse e de não estresse, foram utilizados os seguintes testes estatísticos: Anova ($p<0,001$) e Mann-Whitney ($p<0,001$). Os resultados obtidos na análise comparativa interindividual mostraram valores estatisticamente significantes, logo a estimulação continuada foi confirmada, não havendo diferenças entre os grupos.

Em todos os indivíduos, a saliva turva dos primeiros 2 minutos recuperou a aparência normal semelhante a água após o terceiro minuto de estimulação da saliva na situação de estresse. Os resultados obtidos nesta etapa nos mostram que o fluxo contínuo minimizou os efeitos do sistema simpático.

5.3.2 Caracterização do perfil proteico por eletroforese 1D SDS-PAGE

A figura 5.2 representa a aparência dos géis SDS-PAGE de um único indivíduo e do pool salivar de três indivíduos após serem submetidas à eletroforese e corados com azul de Coomassie. Comparando as amostras dos géis, com fluxo contínuo de 1ml/min, o conteúdo proteico dos voluntários não apresentou diferenças quando rotados em pool ou em amostras individuais. A principal diferença observada foi a intensidade das bandas entre os grupos (figura 5.2)

Figura 5.2 – Gel A- Mostra a separação eletroforética do indivíduo 4S nos tempos T1, T5, T10, T20 e T30, comparado ao pool salivar dos tempos T1-T30 do mesmo indivíduo. Gel B- Mostra a separação eletroforética em pool salivar dos indivíduos 1S, 2S e 3S nos tempos T1, T5, T10, T20 e T30

Gel A

Gel B

Fonte: elaborado pela autora..

Também foi avaliado o comportamento das proteínas na separação eletroforética através da variação intraindividual. A figura 5.3 mostra o perfil da separação eletroforética do voluntário 4S e a figura 5.4 mostra o perfil da separação eletroforética do voluntário 5S em duas ocasiões diferentes. Comparando as amostras dos géis, com fluxo contínuo de 1ml/min, o conteúdo proteico dos voluntários não apresentou diferenças entre as coletas. A principal diferença observada foi a intensidade das bandas (figura 5.3 e figura 5.4).

Figura 5.3 – Gel A- Mostra a separação eletroforética do indivíduo 4S nos tempos T1, T5, T10, T20 e T30, comparado ao pool salivar dos tempos T1-T30 do mesmo indivíduo. Gel B- Mostra a separação eletroforética do mesmo indivíduo em uma segunda coleta. Nota-se que as bandas proteicas se repetem em ambas as coletas, com a diferença apenas de intensidade entre elas

Fonte: elaborado pela autora.

Figura 5.4 – Gel C- Mostra a separação eletroforética do indivíduo 5S nos tempos T1, T5, T10, T20 e T30, comparado ao pool salivar dos tempos T1-T30 do mesmo indivíduo. Gel D- Mostra a separação eletroforética do mesmo indivíduo em uma segunda coleta. Nota-se que as bandas proteicas se repetem em ambas as coletas, com a diferença apenas de intensidade entre elas

Fonte: elaborado pela autora.

A figura 5.5 é representativo da aparência dos géis SDS-PAGE em pool salivar de dois indivíduos em fluxo contínuo de 0,25ml/min após serem submetidas à eletroforese e corados com azul de Coomassie. Nota-se que o padrão de separação eletroforética é semelhante ao gel B da figura 5.2, com diferença de intensidade das bandas entre 75-50 kD, que na figura 5.5 é mais intensa.

Figura 5.5 – Separação eletroforética em pool salivar dos indivíduos 1S, 2S nos tempos T1, T5, T10, T20 e T30 em fluxo contínuo de 0,25ml/min

Fonte: elaborado pela autora.

5.3.2.1 Caracterização do perfil proteico por eletroforese 1D SDS-PAGE em situação de estresse

De acordo com os resultados obtidos na concentração de proteína total (item 5.3.1.1), os tempos escolhidos para analisar em eletroforese 1D SDS-PAGE foram T1 até T6 devido à grande variação da quantidade total de proteínas. Para esse passo as amostras foram rotadas individuais de acordo com a situação de estresse (figura 5.6).

Figura 5.6 – Separação eletroforética dos indivíduos 4S, 5S nos tempos T1 até T6 em fluxo contínuo de 1ml/min. (A) indivíduo A sob estresse; (B) indivíduo B sob estresse; (Ast) indivíduo A após a situação de estresse; (Bst) indivíduo B após a situação de estresse

Fonte: elaborado pela autora.

Nota-se semelhança no padrão de separação eletroforética entre os indivíduos. Na situação de estresse, a intensidade das bandas entre os géis A e B são semelhantes, com diferenças nas bandas com peso molecular abaixo de 15 kD, que no gel B são mais intensas. Já na situação pós estresse (géis Ast e Bst), a intensidade das bandas se tornam menos intensas, porém seguindo o mesmo padrão de separação eletroforética dos géis A e B.

5.3.3 Análise e determinação de Histatinas salivares através da eletroforese com gel nativo catiônico

Para se verificar o ritmo de produção das histatinas salivares pela glândula parótida foram rotados géis nativos catiônicos dos voluntários 3S, 4S e 5S em triplicata. A imagem representativa dos géis das amostras de saliva submetidas à eletroforese com gel nativo catiônico na figura 5.7 mostra as bandas na altura de separação eletroforética relativa à dos padrões de histatinas 1,3 e 5.

Figura 5.7 – Gel representativo da separação eletroforética em gel nativo catiônico nos tempos T1 até T6 em fluxo contínuo de 1ml/min

Fonte: elaborado pela autora.

Os valores de intensidade das bandas representadas pelas Histatinas 1, 3 e 5 foram convertidos em valores de porcentagem, para avaliar o comportamento do ritmo de secreção (Tabela 5.6). Foi considerado o T1 de todas as coletas como sendo o valor de 100% e os demais valores foram calculados a partir desse valor. Alguns indivíduos apresentaram no gel a presença de Lisozima e Histatina 6 que estão discriminados na tabela 5.6.

Tabela 5.6 – Tabela contendo os valores individuais das intensidades de cada banda transformados em porcentagem dos voluntários 3S, 4S e 5S em triplicata nos tempos T1 até T6.

3S	Histatin 1	Histatin 3	Histatin 5	4S	Histatin1	Histatin 3	Histatin5	5S	Lyzozyme	Histatin 15	Histatin 3	Histatin 5	Histatin 6	
T1	100	100	100	T1	100	100	100	T1	100	100	100	100	100	
T2	101,3294	113,7387	99,240961	T2	81,22	117,4	124,8	T2	226,5357	100,26724	99,86491	100,9576	68,18878	
T3	100,3615	86,0325	74,061972	T3	55,3	79,4	87,2	T3	123,246	99,936586	81,70431	73,16991	20,31463	
T4	65,72755	64,34532	54,415314	T4	55	79,4	72,1	T4	73,13689	74,862132	63,83724	56,42479	7,126643	
T5	63,17256	41,09348	50,556227	T5	49,6	83,9	107	T5	46,53882	71,318892	48,71566	54,60194	3,923349	
T6	96,45731	92,13732	68,199227	T6	63,5	88,6	118,8	T6	47,05332	59,939531	52,24984	54,96409	3,681571	
	Histatin 1	Histatin 3	Histatin 5		Histatin1	Histatin3	Histatin5		Lyzozyme	Histatin 1	Histatin 3	Histatin 5	Histatin 6	
T1	100	100	100	T1	100	100	100	T1	100	100	100	100	100	
T2	102,4826	142,9978	112,96381	T2	86,2307	96,363203	107,028	T2	79,20068	104,49629	80,28316	80,8514	65,14375	
T3	81,02774	111,9203	93,84397	T3	69,7754	82,624251	122,041	T3	48,58844	99,420352	74,39865	83,07192	23,29615	
T4	75,48518	91,84777	86,65319	T4	73,8082	83,723989	93,6948	T4	60,11905	111,38786	82,44124	89,02425	107,0421	
T5	64,01001	70,87584	92,862919	T5	28,3071	64,969426	100,282	T5	68,43537	101,79245	81,66631	75,36993	4,155521	
T6	61,93813	87,51312	89,24026	T6	92,492	90,742323	110,187	T6	55,37415	103,94785	99,06859	88,86802	5,888452	
	Histatin 1	Histatin 3	Histatin 5		Histatin1	Histatin 3	Histatin5	Histatin 6	Lyzozyme	Histatin 1	Histatin 3	Histatin 5	Histatin 6	
T1	100	100	100	T1	100	100	100	100	T1	100	100	100	100	
T2	62,99192	58,49361	74,766039	T2	101,329	113,73871	99,241	0,569257	T2	70,18288	104,80539	154,3149	185,3632	85,09703
T3	49,37304	47,76313	63,843008	T3	100,361	86,032501	74,062	28,73012	T3	83,90732	8,74007	158,5622	19,23736	77,0525
T4	54,22008	45,85867	63,465863	T4	65,7275	64,345317	54,4153	3,909656	T4	32,35621	95,699009	136,8737	180,3336	108,9979
T5	40,3873	42,66679	59,506955	T5	63,1726	41,093479	50,5562	3,994726	T5	55,23563	94,981003	130,4282	168,1086	9,423455
T6	44,82236	38,09354	61,737572	T6	96,4573	92,137324	68,1992	6,762323	T6	81,75131	85,298821	133,9772	144,6788	3,60891

Fonte: elaborado pela autora.

Foi utilizado os valores densitométricos das três repetições para as Histatinas 1, 3 e 5 para verificação da hipótese de a secreção salivar dessas proteínas possuírem o mesmo padrão para o mesmo indivíduo. Essa comparação resultou em valor de significância estatística para alguns indivíduos, indicando desta forma que o padrão de secreção de Histatinas não segue uma constante (tabela 5.7 e gráficos 5.8 a 5.10).

Tabela 5.7 – Tabela contendo os valores de p a partir do teste de Kruskal-Wallis. Valores com * foram ajustados pelo teste de Dunn e os resultados estão nos gráficos 5.8 até 5.10

Indivíduo	Mediana do valor densitométrico		Mediana do valor densitométrico		Mediana do valor densitométrico	
	Histatina 1	valor de p	Histatina 3	valor de p	Histatina 5	valor de p
3 S	98	p=0,04*	89	p=0,05	71	p=0,09
	78		95,5		92,5	
	51,5		46		63	
4S	59	p=0,17	85,5	p=0,96	103,5	p=0,034*
	79,5		86,5		103,5	
	98		89		71	
5S	86,5	p=0,04*	72	p=0,0038*	64,5	p=0,08
	102		81,5		85,5	
	94,5		134,5		156	

Fonte: elaborado pela autora.

Gráfico 5.8 – Diferença entre as médias dos postos a partir do teste de Kruskal-Wallis com correção de Dunn dos valores da Histatina 1 do indivíduo 3S. Valores não significativos

Fonte: elaborado pela autora.

Gráfico 5.9 – Diferença entre as médias dos postos a partir do teste de Kruskal-Wallis com correção de Dunn dos valores da Histatina 5 do indivíduo 4S. Valores não significativos

Fonte: elaborado pela autora.

Gráfico 5.10 – Diferença entre as médias dos postos a partir do teste de Kruskal-Wallis com correção de Dunn dos valores da Histatina 1(A) e Histatina 3(B) do indivíduo 5S

Fonte: elaborado pela autora.

Legenda: * Análises com diferença estatisticamente significante ($p < 0,05$)

5.4 ANÁLISE POR ESPECTROMETRIA DE MASSA E IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS

As bandas escolhidas (demarcadas em rosa) para avaliação pela espectrometria de massas dos géis do pool salivar 1ml/min e 0,25 ml/min, indivíduo 4S e 5S e em situação de estresse estão identificadas na figura 5.8.

Para facilitar a compreensão do leitor essa seção foi dividida em etapas.

Figura 5.8 – Imagem representativa dos géis SDS-PAGE após a realização da eletroforese mostrando as bandas selecionadas para identificação do seu conteúdo proteico por espectrometria de massa

Fonte: elaborado pela autora.

5.4.1 Identificação do proteoma salivar – etapa 1

Foram identificados 3874 números distintos de proteínas de acesso no pool salivar das três coletas realizadas sob o fluxo de 1ml/min. Destes 232 números distintos de proteínas de acesso (figura 5.9) apareceram em todas as coletas.

Figura 5.9 – Diagrama de Venn mostrando o número de proteínas encontrados em todas as coletas do pool salivar por meio da análise das bandas de gel de eletroforese SDS-PAGE por espectrometria de massa

Fonte: elaborado pela autora.

Quando verificamos individualmente as coletas, identificamos uma grande discrepância entre os números de acessos referentes as proteínas, com 850 proteínas identificadas na primeira coleta, 1090 proteínas na segunda coleta e 2961 proteínas na terceira coleta (figura 5.10). As proteínas semelhantes identificadas em todos os tempos estão listadas na tabela 5.8.

Esses dados revelam que há diferenças na expressão das proteínas identificadas, mesmo quando padronizamos o mesmo método de coleta e de identificação, demonstrando suscetibilidade as variações dos indivíduos.

Figura 5.10 – Diagrama de Venn mostrando o número de proteínas encontrados em todos os tempos do pool salivar por meio da análise das bandas de gel de eletroforese SDS-PAGE por espectrometria de massa, de acordo com a coleta

Fonte: elaborado pela autora.

Tabela 5.8 – Lista de proteínas identificadas semelhantes em todos os tempos de acordo com a coleta

Coleta	Acesso	Descrição
1C	Q03164	Histone-lysine N-methyltransferase MLL
	E7EMQ1	Carbonic anhydrase 6
	P15516	Histatin-3
	P02814	Submaxillary gland androgen-regulated protein 3B
	P35527	Keratin, type I cytoskeletal 9
	B7ZMD7	Amylase, alpha 1A (Salivary)
	H6VRF8	Keratin 1
	P02812	Basic salivary proline-rich protein 2
	P12273	Prolactin-inducible protein
	C3PTT6	Pancreatic adenocarcinoma upregulated factor
2C	E7EMQ1	Carbonic anhydrase 6
	B7Z854	cDNA FLJ61649, highly similar to Homo sapiens estrogen receptor binding protein (ERBP), mRNA
	Q12955	Ankyrin-3
	P15516	Histatin-3
	G3CIG0	MUC19 variant 12
	E7EPM4	Mucin-17
	Q7RTM4	Spectrin-like protein of the nuclear envelope and Golgi
	P02814	Submaxillary gland androgen-regulated protein 3B
	Q96Q06	Perilipin-4
	P12273	Prolactin-inducible protein
	C3PTT6	Pancreatic adenocarcinoma upregulated factor
	B7ZMD7	Amylase, alpha 1A (Salivary)
3C	O14513	Nck-associated protein 5
	B7Z8R4	ETS-related transcription factor Elf-2
	H0Y589	Histone-lysine N-methyltransferase MLL
	E7EMQ1	Carbonic anhydrase 6
	Q8IY92	Structure-specific endonuclease subunit SLX4
	E1U0S6	Ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat protein Y-linked transcript variant 5
	P98164	Low-density lipoprotein receptor-related protein 2
	Q96Q15	Serine/threonine-protein kinase SMG1
	Q5T1R4	Transcription factor HIVP3
	O75592	Probable E3 ubiquitin-protein ligase MYCBP2
	P56715	Oxygen-regulated protein 1
	Q8NET4	Retrotransposon gag domain-containing protein 1
	E9PAV3	Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha
	H7C2Q8	EBNA1 binding protein 2 isoform CRA_d
	E1A689	Mutant Apo B
	Q8IVE3	Pleckstrin homology domain-containing family H member 2
	G3V279	Enhancer of rudimentary homolog
	P02814	Submaxillary gland androgen-regulated protein 3B

Continua

Conclusão

Coleta	Acesso	Descrição (continuação)
3C	A8K8N5	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase
	Q96Q06	Perilipin-4
	B9ZVP8	Striated muscle preferentially-expressed protein kinase
	Q8TE73	Dynein heavy chain 5, axonemal
	C9JY66	Histone-lysine N-methyltransferase ASH1L
	C3PTT6	Pancreatic adenocarcinoma upregulated factor
	E9PH94	Uncharacterized protein C5orf42
	O15061	Synemin
	F8WD23	Hydrocephalus-inducing protein homolog
	Q9NR99	Matrix-remodeling-associated protein 5
	Q5HYC2	Uncharacterized protein KIAA2026
	Q9NYZ5	Calcium channel alpha1E subunit, delta19 delta40 delta46 splice variant (Fragment)
	O43149	Zinc finger ZZ-type and EF-hand domain-containing protein 1
	Q12955	Ankyrin-3
	P31629	Transcription factor HIVP2
	G3CIG0	MUC19 variant 12
	Q8WX17	Mucin-16
	Q9P273	Teneurin-3
	B4E2D5	Protein FAM48A
	E9PE35	Band 4.1-like protein 4B
	P01833	Polymeric immunoglobulin receptor
	E7EPM4	Mucin-17
	Q5TAX3	Terminal uridylyltransferase 4
	Q59H95	Flightless I homolog variant (Fragment)
	E7ETI5	G-protein-coupled receptor 98
	P04745	Amylase, alpha 1A (Salivary)
	E7EUJ3	Processed PDZ domain-containing protein 2
	Q8NDA2	Hemicentin-2
	Q5VV67	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-related protein 1
	Q6ZP01	RNA-binding protein 44
	Q12830	Nucleosome-remodeling factor subunit BPTF
	F5GWV9	Mucin-12
	A8K171	cDNA FLJ77253, highly similar to Homo sapiens nuclear receptor interacting protein 1 (NRIP1), mRNA
	Q6V0I7	Protocadherin Fat 4
	B4DIZ8	cDNA FLJ54084, moderately similar to Spliceosome RNA helicase Bat1 (EC 3.6.1.-)
	P02812	Basic salivary proline-rich protein 2
	P12273	Prolactin-inducible protein
	Q5T4S7	E3 ubiquitin-protein ligase UBR4
	Q9H7N4	Splicing factor, arginine/serine-rich 19

Também foi analisado as proteínas semelhantes por tempo nas três coletas, para se verificar em qual tempo seria o ideal para se começar a coleta salivar do ducto da parótida. Os resultados estão listados na tabela 5.9.

Tabela 5.9 – Lista de proteínas identificadas semelhantes por tempo de acordo com a coleta.

Tempo	Acesso	Descrição
T1	Q8TEJ8	FLJ00197 protein (Fragment)
	B4DP90	Histone-lysine N-methyltransferase MLL
	E7EMQ1	Carbonic anhydrase 6
	B4DH81	cDNA FLJ61250, highly similar to Homo sapiens GTPase activating Rap/RanGAP domain-like 3 (GARNL3), mRNA
	Q9NYZ5	Calcium channel alpha1E subunit, delta19 delta40 delta46 splice variant (Fragment)
	O60382	KIAA0324 (Fragment)
	Q12955	Ankyrin-3
	Q6N030	Putative uncharacterized protein
	G3CIG0	MUC19 variant 12
	Q8WXI7	Mucin-16
	O75592	Probable E3 ubiquitin-protein ligase MYCBP2
	Q5T1R4	Transcription factor MafK
	F5H4V4	Antigen KI-67
	Q59FP8	Neogenin (Fragment)
	E7ETI5	G-protein-coupled receptor 98
	Q9ULL1	Pleckstrin homology domain-containing family H member 2
	Q12830	Nucleosome-remodeling factor subunit BPTF
	F5GWV9	Mucin-12
	P02814	Submaxillary gland androgen-regulated protein 3B
	Q9NTG1	Polycystic kidney disease and receptor for egg jelly-related protein
	B7ZA42	cDNA, FLJ79056 (Fragment)
	H0YEG8	Nucleobindin-2 (Fragment)
	Q96Q06	Perilipin-4
	H6VRF8	Keratin 1
	Q5H924	HECT, UBA and WWE domain containing 1 (Fragment)
	P02812	Basic salivary proline-rich protein 2
	P12273	Prolactin-inducible protein
	C3PTT6	Pancreatic adenocarcinoma upregulated factor
	B2RU27	Testis expressed 15
	H7BYJ0	Mucin-4
	Q9H7N4	Splicing factor, arginine/serine-rich 19
T5	O14513	Nck-associated protein 5
	E7EMQ1	Carbonic anhydrase 6
	B7Z854	FLJ61649, highly similar to Homo sapiens estrogen receptor binding protein (ERBP), mRNA
	E1NZ88	Ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat protein Y-linked transcript variant 5

Continua

Continuação

Tempo	Acesso	Descrição
T5	P15516	Histatin-3
	B7ZMD7	Amylase, alpha 1A (Salivary)
	G3CIG0	MUC19 variant 12
	O14790	HMG box containing protein 1
	B4E2D5	Protein FAM48A
	Q8NET4	Retrotransposon gag domain-containing protein 1
	E9PAV3	Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha
	C9JJF6	Nuclear receptor corepressor 2
	Q8WXI7	Mucin-16
	B8ZZJ3	Alstrom syndrome protein 1
	P02814	Submaxillary gland androgen-regulated protein 3B
	Q14966	Zinc finger protein GLIS2
	Q08AK7	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase
	Q96Q06	Perilipin-4
	Q8IZF6	Probable G-protein coupled receptor 112
	H6VRF8	Keratin 1
	Q6W4X9	Mucin-6
	P12273	Prolactin-inducible protein
	C3PTT6	Pancreatic adenocarcinoma upregulated factor
	H7C2P2	Protein sidekick-2 (Fragment)
	Q8WYP5	Protein ELYS
	Q4G0X9	Coiled-coil domain-containing protein 40
	Ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat protein Y-linked transcript variant 22	
T10	F4MH52	
	E7EMQ1	Carbonic anhydrase 6
	Q9NYZ5	Calcium channel alpha1E subunit, delta19 delta40 delta46 splice variant (Fragment)
	Q12955	Ankyrin-3
	P31629	Transcription factor HIVP2
	B7ZMD7	Amylase, alpha 1A (Salivary)
	Q9H7T3	Uncharacterized protein C10orf71
	O75592	Probable E3 ubiquitinprotein ligase MYCBP2
	Q8TD57	Dynein heavy chain 3, axonemal
	Q5TAX3	Terminal uridylyltransferase 4
	B8Y0L3	Aspartate beta-hydroxylase (Fragment)
	Q8NDA2	Hemicentin-2
	F5GWV9	Mucin-12
	P02814	Submaxillary gland androgen-regulated protein 3B
	Q96Q06	Perilipin-4
	P02812	Basic salivary proline-rich protein 2
	Q9NR48	Histone-lysine N-methyltransferase ASH1L
	P12273	Prolactin-inducible protein
	C3PTT6	Pancreatic adenocarcinoma upregulated factor
	Q8WZ42	Titin

Continua

Conclusão

Tempo	Acesso	Descrição
T20	B4DP90	Histone-lysine N-methyltransferase MLL
	E7EMQ1	Carbonic anhydrase 6
	Q9NYZ5	Calcium channel alpha1E subunit, delta19 delta40 delta46 splice variant (Fragment)
	O43149	Zinc finger ZZ-type and EF-hand domain-containing protein 1
	Q12955	Ankyrin-3
	Q5T8A7	Protein phosphatase 1 regulatory subunit 26
	P31629	Transcription factor HIVP2
	B7ZMD7	Amylase, alpha 1A (Salivary)
	G3CIG0	MUC19 variant 12
	Q5T1R4	Transcription factor HIVP3
	E7EUW0	Protein FAM190A cDNA FLJ50196, highly similar to Peroxisome proliferator-activated receptor-binding protein (Fragment)
	B4DSK7	
	F5H4V4	Antigen KI-67
	E7EPM4	Mucin-17
	E9PAV3	Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha
	Q8WXI7	Mucin-16
	Q8IVE3	Pleckstrin homology domain-containing family H member 2
	Q9Y6X0	SET-binding protein
	P02814	Submaxillary gland androgen-regulated protein 3B cDNA FLJ78503, highly similar to Homo sapiens keratin 13 (KRT13), transcript variant 1, mRNA
	A8K2H9	
	B9ZVP8	Striated muscle preferentially-expressed protein kinase
	P02812	Basic salivary proline-rich protein 2
	P12273	Prolactin-inducible protein
	C3PTT6	Pancreatic adenocarcinoma upregulated factor
	E9PH94	Uncharacterized protein C5orf42
	Q8IXT1	Nitric oxide-inducible gene protein
	H7C2P2	Protein sidekick-2 (Fragment)
	O15061	Synemin
	Q9UPN3	Microtubule-actin cross-linking factor 1, isoforms 1/2/3/5
T30	E7EMQ1	Carbonic anhydrase 6
	Q5D862	Filaggrin-2
	Q12955	Ankyrin-3
	B7ZMD7	Amylase, alpha 1A (Salivary)
	G3CIG0	MUC19 variant 12
	Q5T1R4	Transcription factor HIVP3
	H0YHA8	Neuron navigator 3 (Fragment)
	P02814	Submaxillary gland androgen-regulated protein 3B
	A8K739	cDNA FLJ77339
	Q8NAH9	cDNA FLJ35331 fis, clone PROST2014659
	Q96Q06	Perilipin-4
	P02812	Basic salivary proline-rich protein 2
	P12273	Prolactin-inducible protein
	C3PTT6	Pancreatic adenocarcinoma upregulated factor
	Q5T4S7	E3 ubiquitin-protein ligase UBR4

Fonte: elaborado pela autora.

Para maximizar a cobertura do proteoma salivar, as diferentes proteínas encontradas (tabela 5.8) foram classificadas (figuras 5.11, 5.12 e 5.13) de acordo com sua função e localização subcelular através do site uniprot (<https://www.uniprot.org/>). As anotações foram organizadas de acordo com a coleta.

Figura 5.11 – Gráficos de acordo com a função e localização subcelular das proteínas semelhantes na coleta 1C

Fonte: elaborado pela autora.

Figura 5.12 – Gráficos de acordo com a função e localização subcelular das proteínas semelhantes na coleta 2 C

Fonte: elaborado pela autora.

Figura 5.13 – Gráficos de acordo com a função e localização subcelular das proteínas semelhantes na coleta 3 C

Fonte: elaborado pela autora.

Quanto à localização subcelular, o proteoma salivar é em maior parte de componentes extracelulares nas duas primeiras coletas, com total diferença na terceira coleta, na qual 47% dos constituintes são de origem nuclear. No que diz respeito as funções moleculares, as proteínas salivares estão distribuídas em atividades catalíticas, estruturais e algumas com atividades desconhecidas.

A respeito das proteínas classificadas como atividades desconhecida, algumas tiveram sua sequência retirada do banco de dados e algumas destas proteínas hipotéticas mostraram similaridades com componentes da matriz extracelular.

Um incrível número de mucinas fora identificado nas amostras, em especial a *Mucin 12*, com síntese no complexo de golgi e membrana plasmática, apresentando como função principal a proteção epitelial e modulação da adesão.

Algumas proteínas como a *carbonic anhydrase 6*, *prolactin-inducible protein* e *polymeric immunoglobulin receptor* possuem papel importante na detecção química do estímulo gustativo amargo.

Outra proteína encontrada apenas na terceira coleta foi a serine/threonine-protein kinase, que possui papel na resposta da via do estresse tóxico causado ao DNA.

Também foram classificadas as proteínas semelhantes por tempo nas três coletas (tabela 5.9), para se verificar em qual tempo seria o ideal para se começar a coleta salivar do ducto da parótida (Figuras 5.14, 5.15, 5.16, 5.17 e 5.18) de acordo com sua função e localização subcelular através do site uniprot (<https://www.uniprot.org/>).

Figura 5.14 – Gráficos de acordo com a função e localização subcelular das proteínas semelhantes no tempo T1

Fonte: elaborado pela autora.

Figura 5.15 – Gráficos de acordo com a função e localização subcelular das proteínas semelhantes no tempo T5

Fonte: elaborado pela autora.

Figura 5.16 – Gráficos de acordo com a função e localização subcelular das proteínas semelhantes no tempo T10

Fonte: elaborado pela autora.

Figura 5.17 – Gráficos de acordo com a função e localização subcelular das proteínas semelhantes no tempo T20

Fonte: elaborado pela autora.

Figura 5.18 – Gráficos de acordo com a função e localização subcelular das proteínas semelhantes no tempo T30

Fonte: elaborado pela autora.

Quanto à localização subcelular, o proteoma salivar por tempo se mostrou com a maior parte dos constituintes de origem desconhecida, em especial no tempo T1, que se mostrou com a maior variedade de funções, com proteínas envolvidas na regulação do apetite e atividade lipídica, porém esse tempo foi o único que não secretou uma importante proteína, a amilase salivar.

5.4.2 Identificação do proteoma salivar – etapa 2

Para diminuir a chance de resultados falsos positivos, os dados foram validados utilizando-se o *percolator* que é um filtro para as amostras analisadas no item 5.4.1. Foram identificados 33 números distintos de proteínas de acesso em todas as três coletas realizadas. Destes, 14 números distintos de proteínas de acesso (figura 5.19) apareceram em todas as coletas.

Quando verificamos individualmente as coletas, identificamos 20 proteínas identificadas na primeira coleta, 27 proteínas na segunda coleta e 23 proteínas na terceira coleta (figura 5.20). As proteínas semelhantes identificadas em todos os tempos estão listadas na tabela 5.10.

Figura 5.19 – Diagrama de Venn mostrando o número de proteínas encontrados em todas as coletas do pool salivar por meio da análise das bandas de gel de eletroforese SDS-PAGE por espectrometria de massa

Fonte: elaborado pela autora.

Figura 5.20 – Diagrama de Venn mostrando o número de proteínas encontrados em todos os tempos do pool salivar por meio da análise das bandas de gel de eletroforese SDS-PAGE por espectrometria de massa, de acordo com a coleta

Fonte: elaborado pela autora.

Tabela 5.10 – Lista de proteínas identificadas semelhantes em todos os tempos de acordo com a coleta

Coleta	Acesso	Descrição
1C	P35527	Keratin, type I cytoskeletal 9
	B7ZMD7	Amylase, alpha 1A (Salivary)
	H6VRF8	Keratin 1
	E7EMQ1	Carbonic anhydrase 6
	P02812	Basic salivary proline-rich protein 2
	P12273	Prolactin-inducible protein
	C3PTT6	Pancreatic adenocarcinoma upregulated factor
	P02814	Submaxillary gland androgen-regulated protein 3B
2C	B7ZMD7	Amylase, alpha 1A (Salivary)
	E7EMQ1	Carbonic anhydrase 6
	P12273	Prolactin-inducible protein
	C3PTT6	Pancreatic adenocarcinoma upregulated factor
	P02814	Submaxillary gland androgen-regulated protein 3B
3C	B7ZMD7	Amylase, alpha 1A (Salivary)
	P01833	Polymeric immunoglobulin receptor
	E7EMQ1	Carbonic anhydrase 6
	P02812	Basic salivary proline-rich protein
	P12273	Prolactin-inducible protein
	C3PTT6	Pancreatic adenocarcinoma upregulated factor
	P02814	Submaxillary gland androgen-regulated protein 3B

Fonte: elaborado pela autora.

5.4.3 Identificação do proteoma salivar – etapa 3

Para identificação do proteoma salivar em um fluxo reduzido, as amostras foram avaliadas em pool salivar e de acordo com a coleta. Na primeira coleta foram identificados 2804 números de acesso de proteínas, 1554 números de acesso na segunda coleta e 1468 números de acesso na terceira coleta (figura 5.21). As proteínas semelhantes encontradas em todos os tempos da coleta estão listadas na tabela 5.11.

Figura 5.21 – Diagrama de Venn mostrando o número de proteínas encontrados em todos os tempos do pool salivar por meio da análise das bandas de gel de eletroforese SDS-PAGE por espectrometria de massa, de acordo com a coleta

Fonte: elaborado pela autora.

Tabela 5.11 – Lista de proteínas identificadas semelhantes em todos os tempos de acordo com a coleta

Coleta	Acesso	Descrição
1C	B7Z8R4	ETS-related transcription factor Elf-2
	H0Y589	Histone-lysine N-methyltransferase MLL
	E7EMQ1	Carbonic anhydrase 6
	Q5D862	Filaggrin-2
	Q96RW7	Hemicentin-1
	P98164	Low-density lipoprotein receptor-related protein 2
	Q5DT20	Hornerin
	Q5T1R4	Transcription factor HIVP3
	Q5SYE7	NHS-like protein 1
	O75592	Probable E3 ubiquitin-protein ligase C12orf51
	A6NK89	Ras association domain-containing protein 10
	Q8NET4	Retrotransposon gag domain-containing protein 1
	E9PAV3	Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha
	B3KQX8	cDNA FLJ33261 fis, clone ASTRO2005902, highly similar to WD repeat protein 20
	P02814	Submaxillary gland androgen-regulated protein 3B
	Q96Q06	Perilipin-4

Continua

Continuação

Coleta	Acesso	Descrição (continuação)
1C	Q6PRD1	Probable G-protein coupled receptor 112
	B9ZVP8	Striated muscle preferentially-expressed protein kinase
	Q9NR48	Histone-lysine N-methyltransferase ASH1L
	P38432	Coilin
	C3PTT6	Pancreatic adenocarcinoma upregulated factor
	P20930	Filaggrin
	Q53QW1	Uncharacterized protein C5orf42
	B4DIL8	Tuberin
	Q8NEV8	Exophilin-5 (Fragment)
	Q9NYZ5	Calcium channel alpha1E subunit, delta19 delta40 delta46 splice variant (Fragment)
	P31629	Transcription factor HIVP2
	Q53S73	Putative uncharacterized protein
	P04745	Amylase, alpha 1A (Salivary)
	G3CIG0	MUC19 variant 12
	Q8WXI7	Mucin-16
	P01833	Polymeric immunoglobulin receptor
	Q5TAX3	Terminal uridylyltransferase 4
	E7EUJ3	Processed PDZ domain-containing protein 2
	Q8NDA2	Hemicentin-2
	F5GWV9	Mucin-12
	Q9UF83	Uncharacterized protein DKFZp434B061
	Q8NBZ3	cDNA FLJ90646 fis, clone PLACE1004279
	H6VRF8	Keratin 1
	P02812	Basic salivary proline-rich protein 2
	B4DIZ8	cDNA FLJ51571, moderately similar to Mediator of DNA damage checkpoint protein 1
	Q6WRI0	Immunoglobulin superfamily member 10
	E7EUA9	Neuron navigator 3
	Q5T4S7	E3 ubiquitin-protein ligase UBR4
	Q8IXT1	Nitric oxide-inducible gene protein
	Q9H7N4	Splicing factor, arginine/serine-rich 19
2C	E7EMQ1	Carbonic anhydrase 6
	Q5D862	Filaggrin-2
	Q9NYZ5	Calcium channel alpha1E subunit, delta19 delta40 delta46 splice variant (Fragment)
	B7Z854	cDNA FLJ61649, highly similar to Homo sapiens estrogen receptor binding protein (ERBP), mRNA
	Q12955	Ankyrin-3

Continua

Conclusão

Coleta	Acesso	Descrição (conclusão)
2C	P04745	Amylase, alpha 1A (Salivary)
	G3CIG0	MUC19 variant 12
	Q8WXI7	Mucin-16
	P01833	Polymeric immunoglobulin receptor
	F5GWV9	Mucin-12
	P01834	Ig kappa chain C
	P02814	Submaxillary gland androgen-regulated protein 3B
	Q96Q06	Perilipin-4
3C	E7EMQ1	Carbonic anhydrase 6
	Q12955	Ankyrin-3
	P04745	Amylase, alpha 1A (Salivary)
	G3CIG0	MUC19 variant 12
	Q8NET4	Retrotransposon gag domain-containing protein 1
	Q8NDA2	Hemicentin-2
	Q8IVE3	Pleckstrin homology domain-containing family H member 2
	F5GWV9	Mucin-12
	P02814	Submaxillary gland androgen-regulated protein 3B
	Q96Q06	Perilipin-4
	Q86XX4	Description Extracellular matrix protein FRAS1
	Q9UPN3	Microtubule-actin cross-linking factor 1, isoforms 1/2/3/5

Fonte: elaborado pela autora.

Para maximizar a cobertura do proteoma salivar, as diferentes proteínas encontradas (tabela 5.11) foram classificadas (figuras 5.22, 5.23 e 5.24) de acordo com sua função e localização subcelular através do site uniprot (<https://www.uniprot.org/>). As anotações foram organizadas de acordo com a coleta.

Figura 5.22 – Gráficos de acordo com a função e localização subcelular das proteínas semelhantes na coleta 1C

Fonte: elaborado pela autora.

Figura 5.23 – Gráficos de acordo com a função e localização subcelular das proteínas semelhantes na coleta 2 C

Fonte: elaborado pela autora.

Figura 5.24 – Gráficos de acordo com a função e localização subcelular das proteínas semelhantes na coleta 3 C

Fonte: elaborado pela autora.

Quanto à função, o proteoma salivar é em maior parte de componentes estruturais e do núcleo, se comportando de forma diferente do encontrado em estímulo constante com alto fluxo, porém quanto à região subcelular a maior parte das proteínas são da região extracelular.

5.4.4 Identificação do proteoma salivar – etapa 4

Para diminuir a chance de resultados falsos positivos, os dados foram validados através do *percolator* para as amostras do fluxo reduzido. Foram identificados 33 números distintos de proteínas de acesso em todas as três coletas realizadas. Destes, 16 números distintos de proteínas de acesso (figura 5.25) apareceram em todas as coletas.

Figura 5.25 – Diagrama de Venn mostrando o número de proteínas encontrados em todas as coletas do pool salivar por meio da análise das bandas de gel de eletroforese SDS-PAGE por espectrometria de massa

Fonte: elaborado pela autora.

Quando verificamos individualmente as coletas, identificamos 27 proteínas na primeira coleta, 23 proteínas na segunda coleta e 20 proteínas na terceira coleta (figura 5.26). As proteínas semelhantes identificadas em todos os tempos estão listadas na tabela 5.12.

Figura 5.26 – Diagrama de Venn mostrando o número de proteínas encontrados em todos os tempos do pool salivar por meio da análise das bandas de gel de eletroforese SDS-PAGE por espectrometria de massa, de acordo com a coleta

Fonte: elaborado pela autora.

Tabela 5.12 – Lista de proteínas identificadas semelhantes em todos os tempos de acordo com a coleta

Coleta	Acesso	Descrição
1C	P0CG05	Ig alpha-1 chain C region
	B7ZMD7	Amylase, alpha 1A (Salivary)
	P01833	Polymeric immunoglobulin receptor
	E7EMQ1	Carbonic anhydrase 6
	P02812	Basic salivary proline-rich protein 2
	C3PTT6	Pancreatic adenocarcinoma upregulated factor
	P0CG05	Ig lambda-2 chain C regions
	P02814	Submaxillary gland androgen-regulated protein 3B
2C	B7ZMD7	Amylase, alpha 1A (Salivary)
	P01833	Polymeric immunoglobulin receptor
	P0CG05	Ig lambda-2 chain C regions
	P02814	Submaxillary gland androgen-regulated protein 3B
3C	B7ZMD7	Amylase, alpha 1A (Salivary)
	E7EMQ1	Carbonic anhydrase 6
	P02812	Basic salivary proline-rich protein 2
	C3PTT6	Pancreatic adenocarcinoma upregulated factor
	P02814	Submaxillary gland androgen-regulated protein 3B

Fonte: elaborado pela autora.

5.4.5 Identificação do proteoma salivar – etapa 5

Nessa etapa as proteínas validas pelo o método do *percolator*, foram comparadas para se ter o real panorama das proteínas secretadas pela a glândula parótida, independente do fluxo salivar. Todas as proteínas consideradas na validação tiveram uma alta sequência de cobertura. Três proteínas foram encontradas em todas as coletas e em todos os tempos avaliados, levando a acreditar que são sintetizadas continuamente pela glândula parótida, tais proteínas são: Amilase, Anidrase carbônica e a *submaxillary gland androgen-regulated protein*. Já a *prolactin-inducible protein* foi encontrada apenas na secreção de 1ml/min.

Outras duas proteínas encontradas em ambos os fluxos salivares, porém não apareceram em duas coletas (1 coleta de 1ml/min e 1 coleta de 0,25ml/min) são: *basic salivary protein-rich protein* e *pancreatic adenocarcinoma upregulated factor*.

5.4.6 Identificação do proteoma salivar – etapa 6

Nessa etapa o proteoma salivar foi avaliado para se observar se há diferenças quantitativas e qualitativas das proteínas expressas na glândula parótica quando avaliadas individualmente ou em pool.

Foi realizado um pool salivar com todos os tempos (T1 até T30) do indivíduo 4Se 5S, respectivamente, e esse foi comparado com os tempos T1, T5, T10, T20 e T30 de cada indivíduo.

Quando avaliamos quantitativamente o indivíduo 4S, 71 elementos foram observados no pool salivar e 487 elementos foi observado quando fazemos a análise individual dos tempos T1, T5, T10, T20 e T30. Os dados foram tabulados e as proteínas semelhantes estão anotados na tabela 5.13.

Tabela 5.13 – Lista de proteínas identificadas semelhantes em todos os tempos de acordo com o tempo

Tempo	Acesso	Descrição
T1, T5, T10, T20 e T30	Q8N4F0	BPI fold-containing family B member 2
	P81605	Dermcidin
	Q8WXI7	Mucin-16
	P04745	Alpha-amylase
	P08493	Matrix Gla protein
	P0DOY2	Immunoglobulin lambda constant 2
	P04745	Alpha-amylase 1
	B4E1T1	cDNA FLJ54081, highly similar to Keratin, type II cytoskeletal 5
	B4DWU6	cDNA FLJ51361, highly similar to Keratin, type II cytoskeletal 6A
	P0DOX2	Immunoglobulin alpha-2 heavy chain
	P12273	Prolactin-inducible protein
	Q96DR5	BPI fold-containing family A member 2
	B2R7Z6	cDNA, FLJ93674
	Q96DA0	Zymogen granule protein 16 homolog B
	Q9UGM3	Deleted in malignant brain tumors 1 protein
	P09228	Cystatin-SA
	A0A087WSV8	Nucleobindin 2, isoform CRA_b
	P02533	Keratin, type I cytoskeletal 14
	Q96K83	Zinc finger protein 729
	P01034	Cystatin-C
	P02768	Serum albumin
	Q7Z5P9	Mucin-19
	P35908	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal
	P17612	cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit beta (Fragment)
	P35527	Keratin, type I cytoskeletal 9
T1 x Pool	Q9UGM3	Deleted in malignant brain tumors 1 protein
	P01833	Polymeric immunoglobulin receptor
	P22079	Lactoperoxidase
	P08779	Keratin, type I cytoskeletal 16
	P81605	Dermcidin
	P09228	Cystatin-SA
	Q8WXI7	Mucin-16
	A0A087WSV8	Nucleobindin 2, isoform CRA_b
	P04745	Alpha-amylase
	P08493	Matrix Gla protein
	P02533	Keratin, type I cytoskeletal 14
	P0DOX2	Immunoglobulin lambda constant 2
	Q8TD57	Dynein heavy chain 3, axonemal
	Q8WZ42	Titin
	P04745	Alpha-amylase 1

Continua

Continuação

Tempo	Acesso	Descrição
T1 x Pool	A6NN14	Zinc finger protein 729
	P01034	Cystatin-C
	B4E1T1	cDNA FLJ54081, highly similar to Keratin, type II cytoskeletal 5
	P13645	Keratin, type I cytoskeletal 10
	P02768	Serum albumin
	E7ETD6	Nucleosome-remodeling factor subunit BPTF (Fragment)
	P0DOX2	Immunoglobulin alpha-2 heavy chain
	P35908	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal
	P12273	Prolactin-inducible protein
	Q6ZW64	cDNA FLJ41552 fis, clone COLON2004478, highly similar to Protein Tro alpha1 H, myeloma
	Q9NP55	BPI fold-containing family A member
	P35527	Keratin, type I cytoskeletal 9 O
	Q96DA0	Zymogen granule protein 16 homolog B
	Q9UGM3	Deleted in malignant brain tumors 1 protein
	P01833	Polymeric immunoglobulin receptor
T5 x Pool	P01009	Alpha-1-antitrypsin
	P22079	Lactoperoxidase
	P08779	Keratin, type I cytoskeletal 16
	P81605	Dermcidin
	P09228	Cystatin-SA
	Q8WXI7	Mucin-16
	B4DRR0	cDNA FLJ53910, highly similar to Keratin, type II cytoskeletal 6A
	A0A087WSV8	Nucleobindin 2, isoform CRA_b
	P04745	Alpha-amylase
	P08493	Matrix Gla protein
	P02533	Keratin, type I cytoskeletal 14
	P0DOX2	Immunoglobulin lambda constant 2
	P23280	Carbonic anhydrase 6
	P10909	Clusterin
	P04745	Alpha-amylase 1
	P25311	Zinc-alpha-2-glycoprotein
	A6NN14	Zinc finger protein 729
	Q5TBF5	Mimecan (Fragment)
	P01034	Cystatin-C
	P04745	Alpha-amylase (Fragment)
	B4E1T1	cDNA FLJ54081, highly similar to Keratin, type II cytoskeletal 5
	P13645	Keratin, type I cytoskeletal 10
	P04745	Alpha-amylase 1
	P02768	Serum albumin
	B7Z759	cDNA FLJ61672, highly similar to Proteoglycan-4 (Fragment)
	A0A1L2BPJ2	Kallikrein-1 isoform 4

Continua

Continuação

Tempo	Acesso	Descrição
T5 x Pool	P55198	Protein AF-17 (Fragment)
	P17612	cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit beta (Fragment)
	P0DOX2	Immunoglobulin alpha-2 heavy chain
	P35908	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal
	P12273	Prolactin-inducible protein
	P01834	Immunoglobulin kappa constant
	P35527	Keratin, type I cytoskeletal 9
	Q9NP55	BPI fold-containing family A member 2
	B4DVE1	cDNA FLJ53478, highly similar to Galectin-3-binding protein
	Q96DA0	Zymogen granule protein 16 homolog B
	P35030	Trypsin-3 (Fragment)
T10 x Pool	Q9UGM3	Deleted in malignant brain tumors 1 protein
	P01833	Polymeric immunoglobulin receptor
	P01833	Alpha-1-antitrypsin
	P22079	Lactoperoxidase
	P08779	Keratin, type I cytoskeletal 16
	P81605	Dermcidin
	P09228	Cystatin-SA
	B4DRR0	cDNA FLJ53910, highly similar to Keratin, type II cytoskeletal 6A
	Q8WXI7	Mucin-16
	A0A087WSV8	Nucleobindin 2, isoform CRA_b
	P04745	Alpha-amylase
	P08493	Matrix Gla protein
	P02533	Keratin, type I cytoskeletal 14
	P0DOX2	Immunoglobulin lambda constant 2
	P23280	Carbonic anhydrase 6
	Q8WZ42	Titin
	P10909	Clusterin
	P04745	Alpha-amylase 1
	A6NN14	Zinc finger protein 729
	P01034	Cystatin-C
	B4E1T1	cDNA FLJ54081, highly similar to Keratin, type II cytoskeletal 5
	P02768	Serum albumin
	A0A1L2BPJ2	Kallikrein-1 isoform 4
	E7ETD6	Nucleosome-remodeling factor subunit BPTF (Fragment)
	P0DOX2	Immunoglobulin alpha-2 heavy chain O
	P35908	Keratin, type II cytoskeletal 2 epiderma
	P12273	Prolactin-inducible protein
	P35527	Keratin, type I cytoskeletal 9
	Q9NP55	BPI fold-containing family A member 2
	Q96DA0	Zymogen granule protein 16 homolog B
	P35030	Trypsin-3 (Fragment)

Continua

Continuação

Tempo	Acesso	Descrição
T20 x Pool	Q9UGM3	Deleted in malignant brain tumors 1 protein
	P01833	Alpha-1-antitrypsin
	P08779	Keratin, type I cytoskeletal 16
	P81605	Dermcidin
	P09228	Cystatin-SA
	B4DRR0	cDNA FLJ53910, highly similar to Keratin, type II cytoskeletal 6A
	Q8WXI7	Mucin-16
	A0A087WSV8	Nucleobindin 2, isoform CRA_b
	P04745	Alpha-amylase
	P08493	Matrix Gla protein
	P02533	Keratin, type I cytoskeletal 14
	P0DOX2	Immunoglobulin lambda constant 2
	Q8TD57	Dynein heavy chain 3, axonemal
	P23280	Carbonic anhydrase 6
	P10909	Clusterin
	P04745	Alpha-amylase 1
	P25311	Zinc-alpha-2-glycoprotein
	A6NN14	Zinc finger protein 729
	P01034	Cystatin-C
	P04745	Alpha-amylase (Fragment)
	B4E1T1	cDNA FLJ54081, highly similar to Keratin, type II cytoskeletal 5
	P02768	Serum albumin
	A0A1L2BPJ2	Kallikrein-1 isoform 4
	A8K739	cDNA FLJ77339
	E7ETD6	Nucleosome-remodeling factor subunit BPTF (Fragment)
	P0DOX2	Immunoglobulin alpha-2 heavy chain
	P35908	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal
	P12273	Prolactin-inducible protein
	Q6ZW64	cDNA FLJ41552 fis, clone COLON2004478, highly similar to Protein Tro alpha1 H,myeloma
	P01834	Immunoglobulin kappa constant
	P35527	Keratin, type I cytoskeletal 9
	Q9NP55	BPI fold-containing family A member 2
	Q96DA0	Zymogen granule protein 16 homolog B

Conclusão

Tempo	Acesso	Descrição
T30 x Pool	Q9UGM3	Deleted in malignant brain tumors 1 protein
	P01833	Polymeric immunoglobulin receptor
	O95996	Adenomatous polyposis coli protein
	P22079	Lactoperoxidase
	P81605	Dermcidin
	P09228	Cystatin-SA
	Q8WXI7	Mucin-16
	A0A087WSV8	Nucleobindin 2, isoform CRA_b
	P04745	Alpha-amylase
	P08493	Matrix Gla protein
	P0DOX2	Immunoglobulin lambda constant 2
	P23280	Carbonic anhydrase 6
	Q8WZ42	Titin
	P10909	Clusterin
	P04745	Alpha-amylase 1
	A6NN14	Zinc finger protein 729
	P01034	Cystatin-C
	B4E1T1	cDNA FLJ54081, highly similar to Keratin, type II cytoskeletal 5
	P02768	Serum albumin
	A0A1L2BPJ2	Kallikrein-1 isoform 4
	A8K739	cDNA FLJ77339
	P0DOX2	Immunoglobulin alpha-2 heavy chain
	P35908	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal
	P12273	Prolactin-inducible protein
	Q6ZW64	cDNA FLJ41552 fis, clone COLON2004478, highly similar to Protein Tro alpha1 H, myeloma
	Q9NP55	BPI fold-containing family A member 2
	Q96DA0	Zymogen granule protein 16 homolog B
	B4DVE1	cDNA FLJ53478, highly similar to Galectin-3-binding protein

Fonte: elaborado pela autora.

A partir dos dados das proteínas obtidas individualmente em cada tempo, foi feita uma relação quantitativa do número total de proteínas encontradas em cada tempo *versus* as proteínas presentes no pool salivar (T1 até T30). Destas 18% (31 proteínas) tiveram relação com o T1, 30% (43 proteínas) tiveram relação com o T5, 26% (37 proteínas) tiveram relação com o T10, 27% (37 proteínas) tiveram relação com T20 e 25,7% (36 proteínas) tiveram relação com T30 (gráfico 5.11). Observamos que em média aproximadamente apenas 25% do conteúdo proteico de cada tempo aparece no pool salivar.

Gráfico 5.11 – Gráfico demonstrando o número total de proteínas encontrada individualmente comparado ao número de proteínas encontradas no pool salivar

Fonte: elaborado pela autora.

Quando avaliamos quantitativamente o indivíduo 5S, 56 elementos foram observados no pool salivar e 219 elementos foi observado quando fazemos a análise individual dos tempos T1, T5, T10, T20 e T30. Os dados foram tabulados e as proteínas semelhantes estão anotados na tabela 5.14.

Tabela 5.14 – Lista de proteínas identificadas semelhantes em todos os tempos de acordo com o tempo

Tempo	Acesso	Descrição
T1, T5, T10, T20 e T30	Q9UGM3	Deleted in malignant brain tumors 1 protein
	P01833	Polymeric immunoglobulin receptor
	P22079	Lactoperoxidase
	Q8WXI7	Mucin-16
	P04745	Alpha-amylase
	P23280	Carbonic anhydrase 6
	D6RD17	Immunoglobulin J chain (Fragment)
	P04745	Alpha-amylase (Fragment)
	P13645	Keratin, type I cytoskeletal 10
	A0A1L2BPJ2	Kallikrein-1 isoform 4
	P35527	Keratin, type I cytoskeletal 9
	P35908	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal

Continua

Continuação

Tempo	Acesso	Descrição
T1 x Pool	Q9UGM3	Deleted in malignant brain tumors 1 protein
	P01876	Immunoglobulin heavy constant alpha 1
	P01833	Polymeric immunoglobulin receptor
	A0A1L2BPJ2	Kallikrein-1 isoform 4
	P22079	Lactoperoxidase
	P08779	Keratin, type I cytoskeletal 16
	Q8WXI7	Mucin-16
	P04745	Alpha-amylase
	P23280	Carbonic anhydrase 6
	P35908	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal
	P25311	Zinc-alpha-2-glycoprotein
	D6RD17	Immunoglobulin J chain (Fragment)
	P01034	Cystatin-C
	P35527	Keratin, type I cytoskeletal 9
	P04745	Alpha-amylase (Fragment)
	Q6P5S8	IGK@ protein
	P13645	Keratin, type I cytoskeletal 10
	P04745	Alpha-amylase 1 (Fragment)
T5 x Pool	Q9UGM3	Deleted in malignant brain tumors 1 protein
	P01833	Polymeric immunoglobulin receptor
	A0A0A0MSP7	FERM and PDZ domain-containing protein 3 (Fragment)
	A0A1L2BPJ2	Kallikrein-1 isoform 4
	P22079	Lactoperoxidase
	Q8WXI7	Mucin-16
	P04745	Alpha-amylase
	P23280	Carbonic anhydrase 6
	Q86YZ3	Hornerin
	D3DP61	KM-HN-1 protein, isoform CRA_a
	P35908	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal
	P25311	Zinc-alpha-2-glycoprotein
	D6RD17	Immunoglobulin J chain (Fragment)
	P35527	Keratin, type I cytoskeletal 9
	P04745	Alpha-amylase (Fragment)
	Q6P5S8	IGK@ protein
	P13645	Keratin, type I cytoskeletal 10

Continua

Continuação

Tempo	Acesso	Descrição
T10 x Pool	Q9UGM3	Deleted in malignant brain tumors 1 protein
	P01833	Polymeric immunoglobulin receptor
	A0A0A0MSP7	FERM and PDZ domain-containing protein 3 (Fragment)
	Q9Y6V0	Protein piccolo
	A0A1L2BPJ2	Kallikrein-1 isoform 4
	P22079	Lactoperoxidase
	Q8WXI7	Mucin-16
	P04745	Alpha-amylase
	P23280	Carbonic anhydrase 6
	P35908	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal
	P25311	Zinc-alpha-2-glycoprotein
	D6RD17	Immunoglobulin J chain (Fragment)
	P01034	Cystatin-C
	P35527	Keratin, type I cytoskeletal 9
	P04745	Alpha-amylase (Fragment)
	P13645	Keratin, type I cytoskeletal 10
T20 x Pool	Q9UGM3	Deleted in malignant brain tumors 1 protein
	P01833	Polymeric immunoglobulin receptor
	Q9Y6V0	Protein piccolo
	P22079	Lactoperoxidase
	Q8WXI7	Mucin-16
	D3DPG0	Titin
	B4DRR0	cDNA FLJ53910, highly similar to Keratin, type II cytoskeletal 6A
	P04745	Alpha-amylase
	P23280	Carbonic anhydrase 6
	Q9H583	HEAT repeat-containing protein 4
	P25311	Zinc-alpha-2-glycoprotein
	D6RD17	Immunoglobulin J chain (Fragment)
	P01034	Cystatin-C
	P04745	Alpha-amylase (Fragment)
	P01876	Immunoglobulin heavy constant alpha 1
	A0A1L2BPJ2	Kallikrein-1 isoform 4
	P35908	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal

Continua

Conclusão

Tempo	Acesso	Descrição
T30 x Pool	Q9UGM3	Deleted in malignant brain tumors 1 protein
	P01833	Polymeric immunoglobulin receptor
	Q9Y6V0	Protein piccolo
	A0A1L2BPJ2	Kallikrein-1 isoform 4
	P22079	Lactoperoxidase
	A0A0J9YVP0	E3 ubiquitin-protein ligase HERC2 (Fragment)
	Q8WXI7	Mucin-16
	P04745	Alpha-amylase
	P23280	Carbonic anhydrase 6
	P35908	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal
	D6RD17	Immunoglobulin J chain (Fragment)
	P01034	Cystatin-C
	Q6P5S8	IGK@ protein
	P13645	Keratin, type I cytoskeletal 10
	P35527	Keratin, type I cytoskeletal 9
	P04745	Alpha-amylase (Fragment)

Fonte: elaborado pela autora.

A partir dos dados das proteínas obtidas individualmente em cada tempo, foi feita uma relação quantitativa do número total de proteínas encontradas em cada tempo *versus* as proteínas presentes no pool salivar (T1 até T30). Destas 41,2% (21 proteínas) tiveram relação com o T1, 52,5% (20 proteínas) tiveram relação com o T5, 34% (19 proteínas) tiveram relação com o T10, 20% (24 proteínas) tiveram relação com T20 e 41% (18 proteínas) tiveram relação com T30 (gráfico 5.12). Observamos que em média aproximadamente apenas 37% do conteúdo proteico de cada tempo aparece no pool salivar.

Gráfico 5.12 – Gráfico demonstrando o número total de proteínas encontrada individualmente comparado ao número de proteínas encontradas no pool salivar

Fonte: elaborado pela autora.

Após a avaliação das proteínas presentes nas tabelas 5.13 e 5.14, notamos que há uma diferença quantitativa das proteínas presentes no pool salivar e quando são analisadas individualmente por tempo. No indivíduo 4S o pool salivar obteve média de cobertura de 25%, enquanto no indivíduo 5S essa média foi de 37%. Também observamos uma relação com valores da média de BCA e o número de proteínas identificadas nessa etapa.

De acordo com os dados obtidos na tabela 5.3, a média do BCA do indivíduo 4S foi de 1225,2 µg/ml e foram encontradas 487 proteínas diferentes, já para o indivíduo 5S a média do BCA foi de 986 µg/ml e foram encontradas 219 proteínas.

Quantitativamente, algumas proteínas foram identificadas em ambos os indivíduos, tais como: *Mucin 16*, *Deleted in malignant brain tumors 1 protein* e *alpha-amylase*.

Já as proteínas *Cystatin SA*, *Cystatin C*, *Prolactin inducible protein*, *Dermicidin*, *Matrix Gla protein* e *Zymogen granule protein 16* foram encontradas em todos os tempos do indivíduo 4S, porém não sendo encontradas em todos os tempos no indivíduo 5S.

As proteínas *Carbonic anhydrase 6*, *Immunoglobulin J chain* e *Kallikrein-1 isoform 4* foram encontradas em todos os tempos do indivíduo 5S, porém não sendo encontrada em todos os tempos no indivíduo 4S.

As proteínas encontradas foram classificadas de acordo com sua função e localização subcelular através do site uniprot (<https://www.uniprot.org/>). As anotações foram organizadas de acordo com o indivíduo (Figuras 5.27 e 5.28).

Figura 5.27- Gráficos de acordo com a função e localização subcelular das proteínas semelhantes do indivíduo 4S

Fonte: elaborado pela autora.

Figura 5.28- Gráficos de acordo com a função e localização subcelular das proteínas semelhantes do indivíduo 5S

Fonte: elaborado pela autora.

Quanto à função, o proteoma salivar individual é em maior parte de componentes da resposta imunológica e estruturais e quanto à região subcelular a maior parte das proteínas são da região extracelular.

Também foi avaliado o proteoma salivar nos tempos T1 até T6, o qual apresentou grande diferença na concentração proteica pelo método do BCA. Foi escolhido o indivíduo 4S, por possuir semelhança na secreção proteica com os indivíduos, que foram alocados para se realizar o pool salivar (indivíduos 1S, 2S e 3S). As proteínas semelhantes a todos os tempos, T1 até T6 estão alocadas na tabela 5.15.

Tabela 5.15 – Lista de proteínas identificadas semelhantes em todos os tempos

Acesso	Descrição
Q8WXI7	Mucin-16
P04745	Alpha-amylase 1
P0DOX2	Immunoglobulin heavy constant alpha 2 (Fragment)
Q0KKI6	Immunoglobulin light chain (Fragment)
B4E1T1	cDNA FLJ54081, highly similar to Keratin, type II cytoskeletal 5
E7ETD6	Nucleosome-remodeling factor subunit BPTF (Fragment)
Q96DR5	BPI fold-containing family A member 2
B2R7Z6	cDNA, FLJ93674
Q9UGM3	Deleted in malignant brain tumors 1 protein
P35908	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal
P35527	Keratin, type I cytoskeletal 9
A8KA24	cDNA FLJ78648, highly similar to Homo sapiens vacuolar protein sorting 54 (yeast) (VPS54), transcript variant 2, mRNA
P08779	Keratin, type I cytoskeletal 16
P04745	Alpha-amylase
P08493	Matrix Gla protein
Q5T112	tRNA (adenine(37)-N6)-methyltransferase (Fragment)
P25311	Zinc-alpha-2-glycoprotein
Q96DA0	Zymogen granule protein 16 homolog B
P01833	Polymeric immunoglobulin receptor
P02533	Keratin, type I cytoskeletal 14
P23280	Carbonic anhydrase 6
P01034	Cystatin-C
P13645	Keratin, type I cytoskeletal 10
B1APF8	cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit beta (Fragment)

Fonte: elaborado pela autora.

O número total de proteínas identificadas no período analisado foi de 730 elementos únicos, sendo estes 27 semelhantes em todos os tempos (T1 até T6). Um dado muito interessante foi o número total de proteínas identificadas seguindo o padrão da concentração proteica aferida pelo método do BCA. No gráfico 5.14 observamos o número total de proteínas identificadas e o valor da concentração do BCA nos tempos T1 até T6 do indivíduo 4S.

Gráfico 5.14 – Relação do número total de proteínas identificadas com o valor da concentração do BCA nos tempos T1 até T6 do indivíduo 4S

Fonte: elaborado pela autora.

5.4.7 Identificação do proteoma salivar – etapa 7

Nessa etapa foi identificado o proteoma salivar na situação de estresse e não estresse. De acordo com os resultados obtidos na concentração de proteína total, os tempos escolhidos para analisar em eletroforese em gel foram T1 até T6 devido à grande variação da quantidade total de proteínas.

A análise dos dados de proteoma revelou 727 proteínas, sendo 415 identificadas em situação de estresse, 218 uma semana após a situação de estresse e apenas 94 foram identificadas em ambas as situações (figura 5.29).

Figura 5.29 - Diagrama de Venn com proteínas semelhantes antes e após situação de estresse

Fonte: elaborado pela autora.

Para identificar as modificações do proteoma salivar em situação de estresse, foi escolhido a partir dos resultados do BCA (Gráfico 5.7 e Tabela 5.5), o tempo com alta concentração proteica versus o tempo com menor concentração de proteica. Um total de 11 proteínas representativas foram identificadas em todos os momentos uma semana após a situação de estresse e 26 sob estresse (tabela 5.15 e figura 5.30).

Tabela 5.15 - Proteínas semelhantes em todos os tempos de coleta identificadas pela espectrometria de massa. Nota-se que as proteínas com * não aparecem em nenhuma coleta durante todo o trabalho apresentado

Acesso	Descrição	Sob estresse	Sem estresse
P04745	Alpha-amylase	X	X
P04745	Alpha-amylase 1	X	X
P25311	Zinc-alpha-2-glycoprotein	X	
Q9UL86	Myosin-reactive immunoglobulin kappa chain variable region (Fragment)*	X	
P01833	Immunoglobulin heavy constant alpha 1	X	
P02812	Basic salivary proline-rich protein 2	X	
B1APF8	cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit beta (Fragment)	X	
P12273	Prolactin-inducible protein	X	
Q96DA0	Zymogen granule protein 16 homolog B	X	
Q9UGM3	Deleted in malignant brain tumors 1 protein	X	X
	Immunoglobulin kappa light chain*	X	
Q9Y6V0	Protein piccolo	X	
P09228	Cystatin-SA	X	
B4DRR0	cDNA FLJ53910, highly similar to Keratin, type II cytoskeletal 6A	X	
Q61781	Keratin, type I cytoskeletal 14	X	X
P23280	Carbonic anhydrase 6	X	X
P01034	Cystatin-C	X	X
P02535	Keratin, type I cytoskeletal 10	X	X
Q7Z5P9	Mucin-19	X	
P35908	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal	X	X
E9PAV3	Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha, muscle-specific form*	X	
P01833	Polymeric immunoglobulin receptor		X
P22079	Lactoperoxidase		X
Q8WXI7	Mucin-16	X	X

Fonte: elaborado pela autora.

Figura 5.30 – **A** Diagrama de Venn com proteínas semelhantes em todos os tempos de coleta sob estresse. **B** Diagrama de Venn com proteínas semelhantes em todos os tempos de coleta após o estresse

Fonte: elaborado pela autora.

Aumentos significantes de algumas proteínas foram observadas apenas na fase de estresse em ambos os indivíduos, incluindo proteínas com protagonismo na defesa contra infecção (*Immunoglobulin heavy constant alpha 1*, *Immunoglobulin kappa light chain*), prevenção da desmineralização dentária (*Basic salivary proline-rich protein 2*), multiplicação celular (*cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit beta*) e algumas com propriedades ainda desconhecidas (*Myosin-reactive immunoglobulin kappa chain variable region*, *Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha*).

As proteínas *cAMP-dependent protein kinase* e *protein piccolo* são proteínas dependentes, pois influenciam diferentes funções biológicas, como a secreção de insulina e auxiliam na fusão de vesículas de membrana intracelular com membrana pré-sináptica, favorecendo a liberação de neurotransmissores, sendo liberadas apenas sob situação de estresse.

Outro dado encontrado bem interessante foi a presença de três proteínas encontradas exclusivamente na situação de estresse, não sendo encontrada em nenhuma outra etapa deste trabalho. As proteínas encontradas têm relação com a imunidade (*Immunoglobulin kappa light chain*), regulação da transcrição e expressão genica (*Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha*, *muscle-specific form*) e uma com função desconhecida (*Myosin-reactive immunoglobulin kappa chain variable region (Fragment)*). Essas proteínas podem ser consideradas possíveis candidatas como biomarcadores da situação de estresse. A função de todas as proteínas encontradas está na figura 5.31.

Figura 5.31 - Função das proteínas anotadas da tabela 5.16

Fonte: elaborado pela autora.

6 DISCUSSÃO

O propósito deste estudo foi o de realizar um compêndio de todas as proteínas expressas na glândula parótida de pacientes saudáveis sob fluxo contínuo, por um período de 30 minutos, para verificar se o proteoma salivar se altera em diferentes fluxos e se a duração do estímulo pode ser considerada como variável na composição da saliva parotídea. Outro aspecto também considerado nesse estudo, foi o de se realizar um padrão ouro, para comparação entre estudos, uma vez que a literatura não possui nenhum estudo catalogando as proteínas expressas sob fluxo contínuo, o que pode trazer falsos positivos em relação a possíveis biomarcadores nas doenças.

Um resultado muito interessante encontrado foi o padrão da concentração da secreção proteica nas amostras de 1ml/min. Os resultados deste trabalho foram semelhantes aos encontrados nos estudos de Colin Dawes^{30,35,36}, em especial ao estudo de 1967³⁰. Nesse estudo, o qual a glândula parótida foi estimulada constantemente com *Sour Lemon Drops*, C.Dawes observou que a concentração proteica varia de acordo com o estímulo salivar. No início da secreção (tempo inicial), quando a saliva ainda é considerada não estimulada, a concentração proteica é de aproximadamente 1600 µg/ml, passando a decair rapidamente até o terceiro tempo e passando a aumentar minuto a minuto durante os 15 minutos de estimulação a taxa de fluxo constante.

Porém em um fluxo salivar menor (0,25ml/min), a mudança na concentração de proteína não foi tão marcada. Em nosso estudo também se observou que em baixo fluxo a concentração salivar de proteínas tende a ser menor durante os 15 minutos de estimulação quando comparada ao primeiro minuto de estimulação.

Outro dado importante dos estudos de C.Dawes^{30,37}, é de que a concentração mesmo após 30 minutos de estimulação constante ao fluxo de 0,25ml/min não era tão alta quando comparada a concentração da saliva secretada a 1ml/min, desta forma sugere que a maior concentração de proteína em altas taxas de fluxo não é dependente do volume total de saliva secretada, mas sim na maior intensidade da estimulação.

Quando avaliamos os resultados obtidos da concentração total de proteínas em situação de estresse, a concentração total foi marcadamente elevada e a saliva possuía aparência turva nos primeiros minutos, que com o decorrer da estimulação ficou com a aparência fluida, igual ao encontrado no estudo de C. Dawes, que avaliou a influência do exercício na saliva da glândula parótida³⁸. Interessantemente, as amostras que estavam turvas possuíam maior concentração proteica que as demais, assim como o encontrado no estudo de C.Dawes³⁸.

A atividade física, assim como a situação de estresse, possui influência na atividade simpática e a concentração proteica aumentada pode ser devido ao aumento da atividade β -simpática nas glândulas salivares. A secreção de proteínas pela glândula parótida sofre influência direta da atividade simpática³⁸.

Quanto ao desenvolvimento dos parâmetros da eletroforese em gel (SDS-PAGE), foi escolhida a quantidade de 20 μ g com a utilização de DTT como agente redutor por apresentar melhor equilíbrio na separação proteica, sem que uma banda confundisse com a outra. Nesse estudo todos os géis apresentaram boa resolução na separação e não houve diferenças quanto à quantidade de bandas quando rodados em pool ou em amostras individuais. A principal diferença foi a intensidade das bandas.

Um grupo de proteínas presentes na saliva da glândula parótida são as *neutral histidine-rich polypeptide (HRP)* que são semelhantes as *PRPs (Proline Rich Proteins)* e *statherin* em virtude de sua alta afinidade pela hidroxiapatita, mas difere acentuadamente na composição de aminoácidos na medida em que contém apenas 1 resíduo de prolina, com pI (ponto isoelelétrico) variando de 7,00 até 9,99^{39,40}. Devido ao seu alto valor de pI, essas proteínas possuem melhor separação através da eletroforese pelo gel nativo catiônico. Os resultados obtidos nessa fase do estudo demonstraram que a produção das histatinas salivares é constante, porém através da análise densitométrica elas não possuem um padrão de secreção constante em um indivíduo. Vale ressaltar que esse foi o primeiro estudo a avaliar a secreção das histatinas salivares sob fluxo contínuo.

A abordagem técnica na análise por espectrometria de massas nesse trabalho foi realizada com associação de duas técnicas, associando o uso da

eletroforese SDS-PAGE para separar as proteínas pelo seu peso molecular com a espectrometria de massa para facilitar a técnica e pelos melhores resultados apresentados. Essa abordagem se apresenta de forma superior, pois a utilização direta da amostra no espectrômetro para a realização do perfil proteômico salivar, pode mascarar o resultado, devido à presença de elementos de maior concentração atrapalharem a identificação dos elementos menos abundantes⁴¹.

Os achados deste trabalho podem comprovar isso, uma vez que as listas de proteínas apresentam uma boa consistência de proteínas similares ao mesmo tempo que apresenta proteínas exclusivas em determinadas coletas e tempos avaliados. Bellavía em seu estudo de 1971⁴², já havia postulado que para se evitar falsos positivos na análise salivar era importante a separação pela eletroforese. Uma vez realizada a separação prévia pela eletroforese é possível se observar os padrões na variação tanto individual, quanto ao pool salivar.

Os resultados dos experimentos mostraram a importância de se explorar a heterogeneidade, tanto no contexto de saúde, quanto no de doença, uma vez que a variação biológica individual se mostrou bem forte. Interessantemente, houve diferença no número total de proteínas expressas na glândula parótida mesmo com um controle rígido nos parâmetros de coleta e análise dos dados. As variações observadas trazem maiores probabilidades no surgimento e eventual desenvolvimento de biomarcadores de caráter clínico.

Outro dado muito interessante, que determinadas proteínas como *Amylase alpha 1A*, *Carbonic anhydrase 6*, *Prolactin-inducible protein*, *pancreatic adenocarcinoma upregulated fator* e *Submaxillary gland androgen-regulated protein 3B* foram encontradas em todos os tempos e em todas as coletas salivares sob fluxo contínuo de 1ml/min quando avaliadas em pool. Esses resultados foram encontrados pela primeira vez todos reunidos em pacientes saudáveis, sendo que a Carbonic anhydrase 6 já foi encontrada como possível marcador na Síndrome de Sjogen^{21,22,27,43}.

Quando prosseguimos com a coleta da saliva ductal, precisamos saber que o sistema ductal salivar é composto por ductos intercalares, dutos estrelados e ductos excretores. Nos ductos excretores, existem células associadas à lâmina basal por hemidesmossomos denominadas células Globlet⁴⁴, que secretam mucina e podem ser encontradas em ductos excretores da glândula parótida. Outro ponto é que entre as 14 mucinas documentadas, quatro estão associadas

à membrana, como MUC1, MUC 4, MUC 16 e MUC 20^{45,46}. Nos resultados com pacientes saudáveis foi encontrada a presença de mucinas transmembrana que também foram encontradas no supplementary file do artigo de Paul Denny²⁴, o qual realizou uma lista das proteínas encontradas na glândula parótida. Porém a expressão dessas proteínas é baixa na saliva parotídea, o que nos leva a acreditar que sua secreção é mais para ajudar no ritmo de secreção salivar e diminuir os danos ao sistema ductal.

Uma mucina encontrada em quase todas as coletas deste estudo, a Mucin 16, é uma mucina glicosilada e tem sido associada a vários tipos de câncer, principalmente ao de ovário ou a doença do enxerto versus hospedeiro⁴⁷. Devido à falta de sensibilidade para o estágio I da doença e falta de especificidade, é de pouco valor na detecção precoce do câncer de ovário^{48,49}. Devido a seus níveis similarmente elevados em algumas condições não malignas, não é específico o suficiente para ser usado para triagem populacional. Nossos resultados podem explicar essa falta de especificidade, uma vez que foi encontrada na saliva de pacientes saudáveis durante o estímulo contínuo.

Outro dado muito interessante nesse estudo foi a dificuldade em se encontrar e expressão de histatinas salivares nos dados da identificação do proteoma salivar. A histatina 3 só foi encontrada na primeira e na segunda coleta do pool salivar sob fluxo de 1ml/min (tabela 5.8). A mesma dificuldade é encontrada nos artigos que compuseram a revisão sistemática, sendo as histatinas encontradas em apenas 4 estudos^{21,24,27,43}. Esses dados nos mostram a importância em se conhecer as proteínas, que se quer identificar para se realizar a correta análise, pois as histatinas 1,3 e 5 foram encontradas em todos os tempos quando se realiza o gel nativo catiônico (tabela 5.6), isso nos leva a acreditar que a análise por espectrometria de massas para as histatinas possui baixa especificidade.

Quando avaliamos as proteínas validadas das coletas de 1ml/min e 0,25ml/min, observamos uma diferença nas proteínas expressas, sendo que na coleta em baixo fluxo há mais proteínas da região nuclear. Outra diferença entre as proteínas secretadas durante o estímulo contínuo de baixo fluxo foram as imunoglobulinas Ig alpha- 1 chain C region e Ig lambda-2 chain region encontradas nas duas primeiras coletas que são glicoproteínas ligadas à membrana ou secretadas por linfócitos B.

Essas proteínas só foram encontradas em um outro estudo, que avaliou a saliva da glândula parótida em pacientes idosos comparado a pacientes jovens²⁵. Nesse estudo a saliva foi coletada durante 5 minutos, sem limitação do volume e com o volume médio variando de 0,4ml até 4,5 ml. Essas proteínas não parecem ter relação direta com o volume de coleta, uma vez que no estudo de D. Preza et al., esse parâmetro não foi controlado. Porém em sua discussão, os autores acreditam que há uma tendência para se ter mais proteínas devido ao menor volume secretado nos pacientes, uma vez que mudanças semelhantes, por exemplo, em uma menor taxa de fluxo e secreções mais concentradas são tipicamente observadas no caso da síndrome de Sjögren.

A partir dos resultados encontrados neste estudo, podemos dizer que essas proteínas não possuem relação com o volume da secreção e sim que elas possuem relação com o tipo de estímulo e com indivíduo, uma vez que na coleta de 0,25ml/min há apenas dois pacientes no pool salivar.

Outro dado muito interessante foi a diferença quantitativa entre as proteínas encontradas no pool salivar *versus* as proteínas encontradas individualmente. Para o indivíduo 4S a média de similaridade do pool com o conteúdo proteico de cada tempo foi de apenas 25%, já para o indivíduo 5S foi de 37%. Pela primeira vez, um estudo mostra essa diferença e nos leva a refletir, se estamos perdendo dados ao se realizar pools salivares para a análise, uma vez que perdemos a própria variação individual.

Um exemplo disso foram as proteínas *Cystatin SA*, *Cystatin C*, *Prolactin inducible protein*, *Dermicidin*, *Matrix Gla protein* e *Zymogen granule protein 16*, que foram encontradas em todos os tempos do indivíduo 4S, porém não sendo encontradas em todos os tempos no indivíduo 5S. Já as proteínas *Carbonic anhydrase 6*, *Immunoglobulin J chain* e *Kallikrein-1 isoform 4* foram encontradas em todos os tempos do indivíduo 5S, porém não sendo encontradas em todos os tempos no indivíduo 4S. Esses dados podem ser no futuro um falso positivo para determinado biomarcador salivar de doenças, pois se em apenas em um único indivíduo aparecer uma determinada proteína, porém com alta expressão, essa proteína será uma séria candidata a se tornar um biomarcador, mesmo não aparecendo em todos os indivíduos.

As *Cystatins* (principalmente do tipo D, S, SA e SN) são conhecidas como inibidoras da cisteína peptidases, mas a sua função real na saliva ainda não é

clara. Muitos estudos acreditam que elas possam estar associadas tanto à síndrome de Sjogren como aos idosos com cáries cervicais²⁵. Os dados obtidos neste estudo podem não colaborar com os estudos já realizados, por possuírem similaridade em condições de normalidade, pois não é específico o suficiente para ser usado para triagem populacional.

Outra proteína encontrada em todos os tempos quando analisadas individualmente foi a *Deleted in malignant brain tumors 1 protein*. Acredita-se que essa proteína possa ser considerada como um gene supressor de tumor candidato para cânceres cerebrais, pulmonares, esofágicos, gástricos^{50,51} e pode funcionar como uma proteína de ligação na saliva para a regulação da sensação de gosto.

Dos estudos levantados na RS, essa proteína foi encontrada apenas no estudo de D.Preza²⁵ et al. e acreditamos que em baixa expressão essa proteína tem maior relação com a percepção gustativa. Porém se faz necessário mais estudos em outras populações saudáveis para se saber sua relação como possível supressor de tumores quando encontrada na saliva de pacientes saudáveis.

Um achado interessante nesse estudo foi a expressão da *Basic salivary proline-rich protein 2* (PRP 2), que foi encontrada apenas sob situação de estresse. Essa ausência pode ser devida tanto a uma concentração de peptídeo menor após a situação de estresse, quanto ao limite de detecção do método ou esta proteína desempenha um papel importante na situação de estresse, que poderia melhorar a adaptação necessária aos tecidos orais, como encontrado em algumas pesquisas, que atribui uma atividade antiviral as *basics PRP*⁵², além das funções de ligação de cálcio, bactérias orais, células epiteliais orais e dietéticas^{52,53}.

Já proteínas *cAMP-dependent protein kinase* e proteína *Piccolo* são dependentes umas das outras porque influenciam diferentes funções biológicas, como a secreção de insulina e auxiliam na fusão de vesículas de membrana intracelular com membrana pré-sináptica, favorecendo a liberação de neurotransmissores. Nesse estudo, essas proteínas foram liberadas apenas sob situação de estresse, o que demonstrou a adaptação do organismo e a ativação do sistema simpático.

Muitos autores acreditam que a alfa-amilase é uma das principais enzimas salivares em humanos, mostrando um aumento e uma resposta clara em uma situação de estresse, que confirma as influências dos estímulos simpáticos^{18,54,55}. Nosso estudo demonstrou pela primeira vez que sob situação de estresse há múltiplos tipos de amilase e isso tem influência na variação interindividual.

Os achados da parte do estresse possuem clara diferença devido ao fato de estudos publicados usarem saliva total como uma ferramenta, para descobrir biomarcadores e não consideram que ela possa conter outras proteínas, como provenientes da inflamação gengival, por exemplo. As secreções glandulares mostraram maior semelhança e poderiam ser usadas como um parâmetro melhor para descobrir novos biomarcadores.

Assim como no estudo de Denny et al²⁴., houve diferenças notáveis na reatividade corporal entre doadores e secreções, uma vez que nesse estudo as proteínas encontradas foram diferentes entre as coletas, sugerindo que a composição do proteoma salivar primário é específica da glândula e pode diferir entre os indivíduos. Outra fonte de variação de amostra para amostra é a formação de complexos proteicos. Estes achados estão de acordo com o conceito de proteômica populacional, pois é uma subdisciplina, que explora a diversidade protéica dentro e entre as populações⁵⁶.

Esse estudo tentou também descobrir se a coleta dos primeiros minutos interferia na quantificação e qualidade das proteínas. Quando comparamos os resultados obtidos na tabela 5.14 com os dados obtidos na tabela 5.3, item T1, T5, T10, T20 e T30 do indivíduo 4S, observamos que há diferenças nas proteínas secretadas nos tempos T1 até T6, sendo apenas uma constante as proteínas *Mucin 16*, *Matrix Gla protein*, *BPI fold-containing Family A member 2*, *cDNA FLJ93674*, *Deleted in malignant brain tumors 1 protein* e *cAMP-dependent protein kinase*.

Esses dados nos levam a acreditar que a glândula parótida é um armazém de determinadas proteínas, sendo capaz de sintetizar algumas proteínas de origem glandular, como é o caso das proteínas anteriormente citadas, suficientemente rápido para repor continuamente durante a secreção salivar. Outra interpretação que podemos ter a partir dos resultados obtidos é de que a síntese de determinadas proteínas acontece ao mesmo tempo que o estímulo

ocorre, não sendo necessariamente estocadas. A partir dos resultados podemos acreditar que não há necessidade de descarte dos primeiros minutos da coleta salivar da glândula parótida.

Os achados desse estudo corroboram com a revisão crítica realizada por Nedelkov et al.⁵⁶, que acredita que há os chamados padrões proteômicos capazes de discriminar entre doença (por exemplo, câncer de ovário, câncer de próstata, etc.) e coortes saudáveis com sensibilidade e especificidade relativamente altas, porém se faz necessário uma avaliação crítica desses resultados, que muitas vezes mostra delineado com deficiências e incertezas significativas em relação à reprodutibilidade dos achados, identidade das proteínas por trás dos picos de padrão e validação dos resultados .

Outro grande desafio na área proteômica é que a composição proteica e peptídica da composição normal da saliva é extremamente complexa, uma vez que na literatura não se tem um padrão a respeito da coleção salivar, o que influencia diretamente nos resultados publicados. Nosso estudo tenta, pela primeira vez, criar um padrão ouro para a coleta salivar, possibilitando a comparação entre pesquisas para melhor compreensão da composição salivar.

O presente estudo utilizou diferentes metodologias para a avaliação do perfil proteômico salivar da glândula parótida, desta forma mostrando que existem diferenças na composição proteômica, mesmo com um padrão rígido de coleta salivar e análise dos dados. Certas proteínas foram encontradas em todas as coletas, levando a acreditar que são secretadas constantemente.

Futuros estudos são necessários para melhor determinar a quantidade relativa das proteínas relacionadas neste estudo, utilizando grupos de maior tamanho amostral, incluindo outras análises utilizando a espectrometria de massas e a validação de algumas proteínas utilizando técnicas, que possuem anticorpos, como Elisa e *Western Blot*.

7 CONCLUSÃO

Através dos resultados obtidos nesse trabalho podemos concluir:

1- Foi realizado um compêndio de todas as proteínas expressas na glândula parótida sob fluxo contínuo. Para as coletas de 1ml/min foram encontradas 850 proteínas na primeira coleta, 1090 proteínas na segunda coleta e 2961 proteínas na terceira coleta. Destas 14 proteínas foram semelhantes em todos os tempos na primeira coleta e segunda coleta e 60 semelhantes na terceira coleta. Qualitativamente as proteínas expressas em todas as coletas foram a *Amylase alpha 1A*, *Carbonic anhydrase 6*, *Prolactin inducible protein*, *Pancreatic adenocarcinoma upregulated fator* e *Submaxillary gland androgen regulated protein*, o que nos leva a acreditar que são produtos de secreção contínua da glândula parótida.

2- Houve diferenças quantitativas e qualitativas das proteínas expressas na glândula parótida quando avaliadas individualmente ou em pool. A variação de similaridade das proteínas encontradas no pool *versus* encontradas na coleta individual variou de 25% até 37%, dependendo do indivíduo estudado.

3- Houve diferença na composição proteica da saliva da glândula parótida em situação de estresse. Um total de 11 proteínas representativas foram identificadas em todos os momentos uma semana após a situação de estresse e 26 sob estresse.

REFERÊNCIAS¹

1. Lee JM, Garon E. Salivary diagnostics. *Orthod Craniofac Res.* 2011; 12(3): 206-211 . doi:10.1016/j.denabs.2011.05.026
2. Proctor GB, Carpenter GH. Salivary secretion: mechanism and neural regulation. *Monogr Oral Sci.* 2014;24:14–29. doi:10.1159/000358781
3. Vitorino R, Lobo MJC, Ferrer-Correia AJ, Dubin JR, Tomer KB, Domingues PM, et al. Identification of human whole saliva protein components using proteomics. *Proteomics.* 2004 Apr;4(4):1109–15. doi:10.1002/pmic.200300638
4. Siqueira WL, Dawes C. The salivary proteome: challenges and perspectives. *Proteomics-Clin Appl.* 2011 Dec;5(11-12):575–9.
5. Hu S, Arellano M, Boontheung P, Wang J, Zhou H, Jiang J, et al. Salivary proteomics for oral cancer biomarker discovery. *Clin Cancer Res.* 2008 Oct;14(19):6246–52. doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-5037
6. Streckfus CF, editor. *Advances in salivary diagnostics*. [local desconhecido]: Springer;2015. doi:10.1007/978-3-662-45399-5
7. Dawes C. Circadian rhythms in human salivary flow rate and composition. *J Physiol.* 1972 Feb 1;220(3):529–45. doi:10.1113/jphysiol.1972.sp009721
8. Hu S, Loo JA, Wong DT. Human saliva proteome analysis. *Ann N Y Acad Sci.* 2007 Mar;1098:323–9. doi:10.1196/annals.1384.015
9. Khurshid Z, Zohaib S, Najeeb S, Zafar M, Slowey P, Almas K. Human Saliva Collection Devices for Proteomics: An Update. *Int J Mol Sci.* 2016 Jun 6;17(12):846. doi:10.3390/ijms17060846
10. Castagnola M, Picciotti PM, Messana I, Fanali C, Fiorita A, Cabras T, et al. Potential applications of human saliva as diagnostic fluid. *Acta Otorhinolaryngol Ital.* 2011;31(6):347–57. unknown
11. Giusti L, Baldini C, Bazzich L, Ciregia F, Tonazzini I, Mascia G, et al. Proteome analysis of whole saliva: A new tool for rheumatic diseases - The example of Sjögren's syndrome. *Proteomics.* 2007;7(10):1634–43. doi:10.1002/pmic.200600783
12. Proctor GB. The physiology of salivary secretion. *Periodontol 2000.* 2016 Feb 1;70(1):11–25. doi:10.1111/prd.12116
13. Neil S. Norton. *Netter - Atlas de anatomia da cabeça e pescoço* - Neil S. Norton - Google Livros. Rio de Janeiro: Elsevier; 2007.
14. Junqueira LCU, Carneiro J-. *Histologia básica: texto e atlas*. 12.ed. (Rio de Janeiro): Guanabara Koogan Editorial Médica Panamericana; 2015.

¹De acordo com o estilo Vancouver

15. Chrousos gp. Stressors, stress, and neuroendocrine integration of the adaptive response: The 1997 Hans Selye Memorial Lecture. *Ann N Y Acad Sci.* 1998 Jun 1;851(1 STRESS OF LIF):311–35. doi:10.1111/j.1749-6632.1998.tb09006.x
16. Ivković N, Božović Đ, Račić M, Popović-Grubač D, Davidović B, Facultatis A, et al. Biomarkers of stress in saliva summary. *Sci J Fac Med Niš.* 2015;32(2):91–9. doi:10.1515/afmnai-2015-0010
17. Breivik T, Thrane PS, Murison R, Gjermo P. Emotional stress effects on immunity, gingivitis and periodontitis. *Eur J Oral Sci.* 1996;104(4(Pt 1)):327–34. doi:10.1111/j.1600-0722.1996.tb00087.x
18. Van Stegeren A, Rohleder N, Everaerd W, Wolf OT. Salivary alpha amylase as marker for adrenergic activity during stress: Effect of betablockade. *Psychoneuroendocrinology.* 2006;31(1):137–41. doi:10.1016/j.psyneuen.2005.05.012
19. Gröschl M, Read GF, Hughes IA, Riad-Fahmy D. Current status of salivary hormone analysis. *Clin Chem.* 2008 Nov 1;54(11):1759–69. doi:10.1373/clinchem.2008.108910
20. Hardt M, Witkowska HE, Webb S, Thomas LR, Dixon SE, Hall SC, et al. Assessing the effects of diurnal variation on the composition of human parotid saliva: quantitative analysis of native peptides using itraq reagents. *Anal Chem.* 2005 Aug;77(15):4947–54. doi:10.1021/ac050161r
21. Using C, Page SDS, Spectrometry M, Hardt M, Thomas LR, Dixon SE, et al. Toward defining the human parotid gland salivary proteome and peptidome. *Biochemistry.* 2005;44(8):2885–99. doi:10.1021/bi048176r
22. Ryu OH, Atkinson JC, Hoehn GT, Illei GG, Hart TC. Identification of parotid salivary biomarkers in Sjögren's syndrome by surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and two-dimensional difference gel electrophoresis. *Rheumatology.* 2006 doi:Sep;45(9):1077–86. 10.1093/rheumatology/kei212
23. Neyraud E, Sayd T, Morzel M, Dransfield E. Proteomic Analysis of Human whole and parotid salivas following stimulation by different tastes. *J Proteome Res.* 2006 Sep;5(9):2474–80. doi:10.1021/pr060189z
24. Denny P, Hagen FK, Hardt M, Liao L, Yan W, Arellanno M, et al. The proteomes of human parotid and submandibular/sublingual gland salivas collected as the ductal secretions. *J Proteome Res.* 2008 May 2;7(5):1994–2006. doi:10.1021/pr700764j
25. Preza D, Thiede B, Olsen I, Grinde B. The proteome of the human parotid gland secretion in elderly with and without root caries. *Acta Odontol Scand.* 2009 Jan 2;67(3):161–9. doi:10.1080/00016350902751545
26. Wu S, Brown JN, Tolić N, Meng D, Liu X, Zhang H, et al. Quantitative analysis of human salivary gland-derived intact proteome using top-down mass spectrometry. *Proteomics.* 2014 May;14(10):1211–22.

doi:10.1002/pmic.201300378

27. Laheij AMGA, Rasch CN, Brandt BW, de Soet JJ, Schipper RG, Loof A, et al. Proteins and peptides in parotid saliva of irradiated patients compared to that of healthy controls using SELDI-TOF-MS. *BMC Res Notes*. 2015 Dec 3;8(1):639. doi:10.1186/s13104-015-1641-7
28. Jasim H, Olausson P, Hedenberg-Magnusson B, Ernberg M, Ghafouri B. The proteomic profile of whole and glandular saliva in healthy pain-free subjects. *Sci Rep*. 2016 Dec 15;6(1):39073. doi:10.1038/srep39073
29. Hall SC, Hassis ME, Williams KE, Albertolle ME, Prakobphol A, Dykstra AB, et al. Alterations in the salivary proteome and n-glycome of sjögren's syndrome patients. *J Proteome Res*. 2017;16(4):1693–705. doi:10.1021/acs.jproteome.6b01051
30. Dawes C. The secretion of magnesium and calcium in human parotid saliva. *Caries Res*. 1967;1(4):333–42. doi:10.1159/000259533
31. Spielberger CD, Gorsuch RL, Lushene RE. *Manual for the state-trait anxiety inventory*. Palo Alto: Consulting Psychologists Pres; 1970.
32. Eisbruch A, Ten Haken RK, Kim HM, Marsh LH, Ship JA. Dose, volume, and function relationships in parotid salivary glands following conformal and intensity-modulated irradiation of head and neck cancer. *Int J Radiat Oncol*. 1999 Oct 1;45(3):577–87. doi:10.1016/S0360-3016(99)00247-3
33. SMART - Servier Medical ART - 3000 free medical images [Internet]. [citado 28 jan. 2018]. Disponível em: <https://smart.servier.com/>.
34. 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 1;14(3):277–94. doi:10.1016/0003-9969(69)90231-3
35. Dawes C. Stimulus effects on protein and electrolyte concentrations in parotid saliva. *J Physiol*. 1984 Jan;346:579–88.
36. 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.
37. Dawes C. The effect of flow rate and length of stimulation on the protein concentration in human parotid saliva. *Arch Oral Biol*. 1967 Jul; 12(7):783–8.
38. Dawes C. The effects of exercise on protein and electrolyte secretion in parotid saliva. *J Physiol*. 1981 Nov;320:139–48.
39. Oppenheim FG, Yang YC, Diamond RD, Hyslop D, Offner GD, Troxler RF. The primary structure and functional characterization of the neutral histidine-rich polypeptide from human parotid secretion. *J Biol Chem*. 1986 Jan 25;261(3):1177–82.

40. Oppenheirnsb FG, Xu T, Mcmillians FM, Levitzli SM, Diamondl RD, Offnero GD, et al. Histatins, a novel family of histidine-rich proteins in human parotid secretion. *J Biol Chem*. 1988;263(16):7472–7.
41. Walker JM, editor. *The proteomics protocols handbook*. Totowa, NJ: Humana Press; 2005. doi: 10.1385/1592598900
42. Bellavía SL. Electrophoresis of proteins from human parotid saliva. *Arch Oral Biol*. 1971 Jul;16(7):751–8.
43. Walz A, Stühler K, Wattenberg A, Hawranke E, Meyer HEE, Schmalz G, et al. Proteome analysis of glandular parotid and submandibular-sublingual saliva in comparison to whole human saliva by two-dimensional gel electrophoresis. *Proteomics*. 2006 Mar;6(5):1631–9. doi:10.1002/pmic.200500125
44. Miller CS, Foley JD, Bailey AL, Campell CL, Humphries RL, Christodoulides N, et al. Current developments in salivary diagnostics. *Biomark Med*. 2010 Feb;4(1):171–89.
45. Ma J, Rubin BK, Voynow JA. Mucins, mucus, and goblet cells. *Chest*. 2018 Jul;154 (1):169-76. doi:10.1016/j.chest.2017.11.008
46. Frenkel ES, Ribbeck K. Salivary mucins in host defense and disease prevention. *J Oral Microbiol*. 2015;7:29759. doi:10.3402/JOM.V7.29759
47. Souza MM de, de Paula FM, Hsieh R, Macedo MCMA, Corral MA, Nunes TB, et al. Could mucin 16 and colony-stimulating factor 2-receptor beta possible graft versus host disease biomarkers? Medical hypotheses. *Med Hypotheses*. 2017 Mar;100:89–93. doi:10.1016/j.mehy.2017.01.017
48. Argueso P, Tisdale A, Spurr-Michaud S, Sumiyoshi M, Gipson IK. Mucin characteristics of human corneal-limbal epithelial cells that exclude the rose bengal anionic dye. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2006 Jan 1;47(1):113. doi:10.1167/iovs.05-0735.
49. O'Brien TJ, Beard JB, Underwood LJ, Dennis RA, Santin AD, York L. The CA 125 gene: an extracellular superstructure dominated by repeat sequences. *Tumor Biol*. 2001;22(6):348–66. doi:10.1159/000050638
50. Mollenhauer J, Wiemann S, Scheurlen W, Korn B, Hayashi Y, Wilgenbus KK, et al. DMBT1, a new member of the SRCR superfamily, on chromosome 10q25.3–26.1 is deleted in malignant brain tumours. *Nat Genet*. 1997 Sep;17(1):32–9. doi:10.1038/ng0997-32
51. Mollenhauer J, Herbertz S, Helmke B, Kollender G, Krebs I, Madsen J, et al. Deleted in Malignant Brain Tumors 1 is a versatile mucin-like molecule likely to play a differential role in digestive tract cancer. *Cancer Res*. 2001 Dec 15;61(24):8880–6.
52. Beeley JA. Basic proline-rich proteins: Multifunctional defence molecules? *Oral Dis*. 2001 Mar;7(2):69–70. doi:10.1034/j.1601-0825.2001.0070201.x

53. Messana I, Cabras T , Inzitari R, Lupi A , Zuppi C, Olmi C, et al. Characterization of the human salivary basic proline-rich protein complex by a proteomic approach. *J Proteome Res.* 2004 Jul-Aug; 3(4):7921-800; doi:10.1021/PR049953C
54. Valentin B, Grottke O, Skorning M, Bergrath S, Fischermann H, Rörtgen D, et al. Cortisol and alpha-amylase as stress response indicators during pre-hospital emergency medicine training with repetitive high-fidelity simulation and scenarios with standardized patients. *Scand J Trauma Resusc Emerg Med.* 2015 Apr 8;23:31. doi:10.1186/s13049-015-0110-6
55. Nater UM, Rohleder N. Salivary alpha-amylase as a non-invasive biomarker for the sympathetic nervous system: Current state of research. *Psychoneuroendocrinology.* 2009 May;34(4):486–96. doi:10.1016/j.psyneuen.2009.01.014
56. Nedelkov D, Kiernan UA, Niederkofler EE, Tubbs KA, Nelson RW. Population proteomics: the concept, attributes, and potential for cancer biomarker research. *Mol Cell Proteomics.* 2006 Oct 1;5(10):1811–8. doi:10.1074/mcp.R600006-MCP200

Apêndice A – Artigo aceito na **Brazilian Oral Research** em **05/11/2018** e aguardando produção

BOR.2018-0682 - Critical Review of Literature - Stomatology

Diagnostic Potential of Saliva Proteome Analysis: A Review and Guide to Clinical practice

Camilla Vieira Esteves, Wladimir Gushiken de Campos, Milena Monteiro de Souza, Silvia Vanessa Lourenço, Walter L. Siqueira, Celso Augusto Lemos-Júnior

Camilla Vieira Esteves – DDs, MsC, PhD candidate, Department of Stomatology, School of Dentistry, University of São Paulo, São Paulo, Brazil.

Email: camilla.santos@usp.br

Wladimir Gushiken de Campos – DDs, Master's Degree student, Department of Stomatology, School of Dentistry, University of São Paulo, São Paulo, Brazil.

Email: wgushiken@gmail.com

Milena Monteiro de Souza – PhD, Department of Dermatology, School of Medicine, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

Email: milenamsouza@usp.br

Silva Vanessa Lourenço – DDs, PhD, Department of General Pathology, Dental School, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

Email: silvialourenco@usp.br

Walter L. Siqueira- DDs, PhD, Schulich School of Medicine & Dentistry, University of Western Ontario, London, ON, Canada

Email: wsiqueira@uwo.ca

Celso Augusto Lemos-Júnior – DDs, PhD, Associate Professor, Department of Stomatology, School of Dentistry, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

Email: calemosj@usp.br

Corresponding Author:

Dr. Celso Augusto Lemos Júnior

E-mail: calemosj@usp.br

Abstract

Proteomic techniques have become popular in medicine and dentistry because of their widespread use in analyzing bodily fluids such as blood, saliva, urine, and gingival crevicular fluids as well as hard tissues such as enamel, dentine, and cementum. This review is a guide to proteomic techniques in general dentistry, summarizing techniques and their clinical application in understanding and diagnosing diseases and their use in identifying biomarkers of various diseases.

Keywords: Proteomics; Mass spectrometry; Diagnosis; Polyacrylamide gel electrophoresis, Saliva.

Introduction

Working with proteins, specifically with proteins from saliva, has been the focus of many research groups around the world during the last decade. Although the area is of widespread interest, many health professionals remain unaware of this technique or its applications. Here, therefore, we review the literature on the subject to update professionals in the field.

Proteomics—the study of the “proteome”—is widely used to analyze bodily fluids including blood, saliva, urine, sperm, gingival crevicular fluids, cervical-vaginal fluid and hard tissues such as enamel, dentine, and cementum, and is popular in both medicine and dentistry. With technological advances, and the utility of saliva as an indicator of systemic health that can be easily sampled using non-invasive methods¹, with approximately 64% of human oral tissues studied to date².

This review introduces use of proteomic analysis of saliva samples to general dentistry, summarizing its methodology, and clinical applications in studying disease.

What are proteins?

Proteins are diverse, genome-encoded biological macromolecules found in all cells. Proteins are covalently linked linear chains of combinations of 20 amino acids. Amino acids are the alphabet from which protein sequences are written; each amino acid has a side chain with distinct chemical properties^{3,4}, meaning that different proteins made of different amino acid sequences have different properties. The number of possible combinations of amino acids explains how proteins can be the building blocks of all organisms on earth, forming diverse components including enzymes, hormones, antibodies, transporters, spider webs, muscle fibers, and milk proteins³. This vast functional range, from a combination of simple building blocks, was captured by Sir Francis Crick: *“The most significant thing about proteins is that they can do almost anything”*. *“Although proteins can act in so many ways, the way in which they are synthesized is probably uniform and rather simple, and this fits in with the modern view that gene action, being based on the nucleic acids, is also likely to be uniform and rather simple”*⁵.

Siqueira & Dawes⁶ believe that understanding protein function in the context of cells and bodily fluids is essential. Tools such as proteomic analysis are now contributing to our knowledge of this topic.

What is the proteome, and proteomics?

The concept of the “proteome” to describe a mixture of proteins was proposed by Wilkins et al.⁷ and Wasinger et al.⁸, with the name being a *contraction of the “**PRO**teins” encoded by a given “gen**OME**”, cell, or tissue type^{7,8}*. A proteome has some differences from a genome⁷ because it also takes into account post-transcriptional and post-translational process such as complex formation and covalent modification⁹.

Interestingly, the proteome changes under different conditions, such as physiological changes, or different stages of the cell cycle.^{7,9} Proteomics profiling is the study of protein transcriptional profiles and interactions across all expressed proteins¹⁰, across cells, organisms, and even ecosystems, offering essential insights to understanding the function of proteins—and their roles in health¹.

This review focuses on the use of mass spectrometry-based proteomics and can be divided into two fundamental strategies that provide different information on the proteome: bottom-up proteomics reports proteome composition, while top-down proteomics reports protein interactions and structure. In bottom-up proteomics, proteolytic digestion using trypsin yields protein fragments that can be identified using mass spectrometry, enabling inference of the proteins in the undigested sample (for example, shotgun gel-free proteomics)^{11,12}. Top-down proteomics uses mass spectrometry to analyze intact proteins, using direct protein fragmentation in gas-phase for insights into protein structure and complex formation; major examples are: High-Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (HPLC-MS), tandem mass-spectrometry (MS/MS) and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight MS/MS (MALDI-TOF MS/MS)¹³.

Bottom-up proteomics is the most common approach. Bottom-up proteomics identifies proteins in a proteome by cross-referencing the masses of proteolytically-cleaved proteins measured by MS/MS to a pre-computed proteomic database. MS/MS is often preceded by separation using one-

dimensional (1-D) or two-dimensional (2-D) gel electrophoresis, band excision, and in-gel digestion¹⁴, described in more detail below.

These fundamental proteomics strategies can be used for characterizing the proteome of a secretory gland, or whole saliva, and are capable of evaluating variation to distinguish normal and pathological proteomes toward identifying possible diseases biomarkers. Here we review sample purification, and describe ionization, mass analysis, and detection within the mass spectrometer for salivary proteomic analysis.

Protein purification techniques

To understand protein structure and function, it is first necessary to purify the protein. Various tools contribute to the purification process, including absorbance colorimetry, liquid chromatography, native and denaturing one-dimensional (1-D) and two-dimensional (2-D) gel electrophoresis, and western blotting.

Absorbance colorimetry measures light absorbance of a solute at specific wavelengths, allowing inference of the concentration of solute. Absorbance measurements enable the researcher to keep track of protein concentrations during the purification process

The core technique in protein purification is liquid chromatography, that separates proteins according to various properties, complementing later electrophoretic separation. Different types of liquid chromatography separate proteins as they pass through a column based on different protein properties. Anionic or cationic ion-exchange columns specifically bind proteins based on charge; bound proteins are subsequently eluted by changing the ionic strength of the elution buffer. Size exclusion (also referred to as gel-filtration) columns separate proteins based on size, larger proteins are eluted first, while migration of smaller proteins is retarded by the column matrix. The matrix of affinity chromatography columns is decorated with chemical moieties; only specific proteins—usually due to genetic fusion of a moiety-binding affinity tag—bind these moieties, meaning that after washing other proteins from the column, an almost-pure sample of the tagged protein can be eluted from the column by adding a competing soluble chemical to the elution buffer. Liquid chromatography is usually performed using a High-Performance Liquid Chromatography (HPLC)

pump device³. Individual liquid chromatography steps can be limited by co-elution of many different proteins, usually necessitating use of different consecutive techniques before acquisition of a pure protein sample.

Whether separated by chromatography, proteins are usually subsequently separated by native or denaturing gel electrophoresis in conjunction with western blotting to detect specific proteins using antibodies.

- **Protein separation and characterization by polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)**

Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) visualizes intact proteins, including isoforms of the same protein, at different positions on the gel¹³.

Either 1-D or 2-D PAGE can be used to separate components of the protein sample. One-dimensional PAGE separates proteins by molecular weight. Two-dimensional PAGE first separates proteins in 1-D by their isoelectric point (pI) using an immobilized pH gradient (IPG) strip that focuses each protein to the pH at which the protein has zero net charge; in the second dimension, the IPG strip is laid across the top of a polyacrylamide gel for electrophoretic separation by size, as in 1-D gel electrophoresis^{15–17}.

The protocol chosen for 2-D PAGE should optimally solubilize all proteins analyzed, remove contamination, prevent protein aggregation during focusing, and avoid chemical modification of the sample. Proteins are denatured and solubilized using high concentrations of urea; thiourea can be added to further increase the solution's solubilization ability. Reducing agents are typically added to reduce disulfide bonds, although the most commonly used reducing agent, dithiothreitol (DTT), is responsible for "point streaking" artefacts in 2-D gels, depending on the sample¹⁸, which must be considered during protocol development.

Due to its ability to resolve approximately 5,000 different proteins, depending on the size of gel^{18,19}, 2-D PAGE continues to be widely used to study the proteome, and can successfully characterize post-translational modifications and mutant proteins.

Protein separation according to molecular weight is based on pore sizes within the polyacrylamide gel. Those pores can be modified to optimally separate proteins of interest by changing the acrylamide percentage when making the gel.

Sodium dodecyl sulfate (SDS)-PAGE is a type of 1-D PAGE that enables separation of proteins based purely on their molecular weight. SDS-PAGE involves addition of SDS when making the gel, and heat-denaturing the protein sample (i.e., unfolding their native structural conformation) by disrupting non-covalent bonds. Negatively-charged SDS molecules coat the unfolded protein in proportion to the protein's molecular weight; thus protein SDS-PAGE separation is not influenced by protein structure, and is directly proportional to protein molecular weight alone.

Proteins are visualized in the gel after electrophoresis by staining. Coomassie blue is the best-known protein staining technique. Because Coomassie blue's detection limit is around 100 ng, however, small proteins, even when abundant, are difficult to visualize. In cases involving low proteins concentrations, high-sensitivity silver staining, capable of detecting less than 1 ng protein, can be used¹⁸. Silver staining methods using aldehyde-based fixatives/sensitizers, however, prevent subsequent protein analysis by mass spectrometry (MS) due to protein cross-linkage¹⁹.

SDS-PAGE is an analytical technique incapable of direct identification of the separated proteins. Proteins(s) of interest can be identified by specific antibodies in a western blot, or by gel extraction, proteolysis, and MS or MS/MS analysis.

- **Protein separation and characterization by native gels**

Although SDS-PAGE is the most common form of PAGE protein separation, native PAGE of the natively-folded protein can also be performed without SDS²⁰. Because native PAGE separates proteins according to both their charge and hydrodynamic size, it provides complementary information to an SDS-PAGE gel. Because native PAGE is a kind of 1-D electrophoresis that separates proteins by charge, protein pI and electrophoresis pH will influence protein mobility.

- **Protein identification by western Blot**

Western blotting using a specific antibody can locate a specific protein in a gel. Proteins are first separated by PAGE, the gel transferred onto a membrane, incubated with a specific antibody, and antibody location visualized^{3,21}. In the western blot analysis, the passage of gel electrophoresis is included to solve the cross-reactivity problem of the antibodies²².

The amount of protein in a sample that will be study by this technique can be quantified for comparison between groups.

Methodology in Proteomics

1. Protein Ionization techniques

For proteomic analysis, as many proteins as possible in the sample must be identified using mass spectrometry. Mass spectrometry requires that proteins in solution or solid state are ionized in gas phase for injection and acceleration in an electric or magnetic field for analysis. The two main ionization methods that minimize sample fragmentation are MALDI (Fig. 1A) and ESI²³ (Fig. 1B). ESI is used for aqueous solutions, in which a syringe containing the sample is forced through a hypodermic needle connected to a high-voltage power supply. The high voltage induces an intense electric field at the needle tip that disperses the sample into a fine spray of charged droplets; the solvent subsequently evaporates in a warmed chamber, leaving desolvated sample ions^{24,25}. MALDI, on the other hand, involves embedding the sample in an organic matrix that is sublimed by pulses of a ultraviolet (UV) laser, forming gaseous peptide or protein ions for MS analysis^{25,26}.

2. Mass analysis of proteins

After ionization by MALDI or ESI, ion mass-to-charge (m/z) ratios are measured by the mass spectrometer. Protein mass analysis is performed either “in space” or “in time”, enabling recording over a wide range of masses^{20,23}. In space m/z measurements are performed sequentially through the travel of ions into an instrument such as triple quadrupole (TQ), quadrupole/time-of-flight (Q-TOF), or time-of-flight/time-of-flight (TOF-TOF). In time analyses use the same analyzer, such as quadrupole ion trap (Q-IT)²⁶.

The most widely used instruments for peptide mass analysis are time-of-flight (TOF) analyzers. The ion is accelerated with speed inversely proportional to mass by the potential difference between electrodes in a vacuum tube; the time of detection is therefore proportional to m/z . The time of flight can be used to calculate the m/z value, and a plot of m/z versus intensity (ion count), or MS spectrum, generated for interpretation on a workstation^{27,28}. Each m/z peak in the

MS spectrum is subsequently annotated by cross-referencing to a database such as MASCOT²⁹ or SEQUEST.

3. Tandem Mass Spectrometry (MS/MS) for protein identification

Tandem Mass Spectrometry, popularly known such as MS/MS, is a technique that can deduce protein sequences based on patterns of protein fragmentation in a collision chamber located between two mass spectrometers³⁰. Sample ions are introduced into the first mass spectrometer as described above, separated by charge, and selected m/z ions directed to the collision chamber for fragmentation by collision with neutral atoms or molecules. Resulting peptide fragments are directed to the second mass spectrometer for m/z analysis. The tandem mass spectra represent the peptides derived from successive fragmentations, and, can be used to deduce the precise sequence of amino acids in the sample²⁶ (Fig. 2).

4. Data analysis to identify proteins

Integral to MS spectrum annotation is cross-referencing observed m/z peaks with established databases. The most popular databases, MASCOT and SEQUEST^{31,32}, are used to determine which peptide sequence in a protein database corresponds to each m/z peak³². SEQUEST, the first major database-based search algorithm established in 1994, uses cross-correlation to analyze the similarity between experimental and theoretical mass spectra. The other major software, MASCOT, introduced in 1999, is based on a probability-based score^{26,33}. MASCOT is universally used by research facilities around the world and uses a probabilistic scoring algorithm for protein identification that was adapted from the MOWSE algorithm³⁴. MASCOT is freely available but acquiring a license introduces additional features^{29,35}. For the best match of the protein sequence, MASCOT employs the widely used significance level of 0.05.

The SEQUEST database is typically used when trypsin is used for protein digestion, and peptides are separated by liquid chromatography before proceeding to MS/MS. This procedure producing several MS/MS spectra and the SEQUEST database was the first software to fulfill this need^{9,36}.

5. Salivary proteome databases

Approximately 60% (11716) of all human proteins (19613) are expressed in the salivary gland, and of these, the expression of 85 is elevated compared with other tissue types³⁷ as demonstrated by recent development of the Human Protein Atlas portal (www.proteinatlas.org), an interactive, frequently-updated database that catalogues proteins predicted to be expressed based on RNA level³⁸.

Work on salivary proteomics and bioinformatic analysis tools has developed significantly in recent years, enabling cataloging of proteins found in saliva, relationship of the salivary proteome to other proteomes, and highlighting different proteome profiles for different salivary glands. A 2009 study that focused on fractionating the salivary proteome identified 2340 salivary proteins, of which 20% matched plasma proteome proteins³⁹; a subsequent review by Amado *et al.* in 2013 listed more than 3,000 different salivary proteins⁴⁰. Interestingly, this database identified proteins expressed at elevated levels in salivary glands and created a map of differential salivary gland protein expression from ductal epithelial cells, and serous or mucinous cells. According to the Human Protein Atlas, and confirmed using antibody based profiling and proteogenomics³⁸, four examples of proteins more expressed in serous salivary glands are CA6, CST2 and PIP and AMY1B. One example of a protein specific for mucinous salivary glands is MUC7, and one example expressed in salivary ducts is SLC5A5.

Another important information to better understand the finds in mass-spectrometry is the database for updated information about protein sequence, functions, and annotation data is The Universal Protein Resource - UniProt (<https://www.uniprot.org>). The UniProt databases are a combination of the UniProt Knowledgebase (UniProtKB), UniProt Reference Clusters (UniRef), and the UniProt Archive (UniParc). UniProt emerged as a collaborative online platform between the European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI), the SIB (Swiss Institute of Bioinformatics) and the Protein Information Resource (PIR), that are together responsible for database curation, software development and support.

6. Secreted salivary proteins

Around 400 salivary proteins have been identified by gel electrophoresis^{1,40–42}; the most abundant are mucins, proline rich proteins (PRPs), statherin, histatins, amylase, and lysozyme:

- Five types of mucins identified in the oral cavity are MUC5B, MUC7, MUC19, MUC1, and MUC4, each composed of a unique domain structure that influences its properties⁴³. Salivary mucins are produced in submandibular, sublingual, and minor salivary mucous glands to bind and retain antibacterial proteins in the oral cavity to prevent T-cell and epithelial cell infections^{13,43–45}.
- PRPs, encoded by PRB1, are expressed in the serous gland, and are subdivided into acidic (aPRPs), basic (bPRPs) and basic-glycosylated (gPRPs)^{11,46}. The main function of aPRPs is bind and maintain the concentration of calcium in saliva.
- Statherin maintains a supersaturated level of calcium in the saliva by preventing its precipitation. Statherin helps remineralization of teeth^{13,47}. Its concentration is not influenced to circadian rhythms, that could be very interesting, one time that the period of collection did not interfere in the result.
- Histatins are antibacterial and antifungal proteins that are among the most abundant salivary proteins; histatins 1,3 and 5 were first described by Oppenheim *et al.*⁴⁸ in 1988 who linked their presence to anti-fungal activity against *Candida albicans*. Consistent with this first study, Siqueira *et al.*⁴⁹ found histatins within the acquired enamel pellicle that may protect against acid damage; *in vitro* studies by Moffa *et al.*⁵⁰ suggest that a histatin 5 coat on epithelial cell surfaces reduces *C. albicans* colonization; and Siqueira *et al.*⁵¹ used a proteomic approach to identify 43 complexes of histatin 1 with other salivary proteins, finding that the killing activity of a histatin 1/amylase complex is better than histatin 1 alone, for example.
- Salivary amylase, the most abundant secreted protein in parotid saliva, catalyzes hydrolysis of starch into sugars^{52,53}. There are five human

amylase isoenzymes and three are found in saliva can be assigned to family A and family B, based on differences in post-translational glycosylation content⁵³. Glycosylated Family A has molecular weight of 62 kDa whereas nonglycosylated Family B has a molecular weight of 56kDa⁵⁴. Due to its abundance in saliva, amylase may play an additional role in maintaining oral mucosa. A recent proteomics study analyzing the interactome of amylase in whole saliva⁵⁵ confirmed that amylase interacts with mucins, although histatins were not detected likely due to their short lifespan in whole saliva. These findings suggested that amylase both protects and functionally modulates its partners in addition to digesting carbohydrates.

7. Clinical Applications of salivary proteomics

Proteomic approaches were initially used to characterize all proteins in a given cell. As the technique developed, however, the goal shifted to detect differences in proteomes related to disease. The proteomic approach allowed control the gene transcriptions through the interconnection of the extracellular microenvironment that characterizes the information flow over protein pathways. Future progress will enable understanding the course of the disease and identification of disease biomarkers, enabling early detection, and targeted, patient-tailored therapy.

Clinical research using proteomics is growing. A review by Colantonio et al.⁵⁶ on clinical application of proteomics in 2004 found 192 articles; In an update at 2018 made for this review, our group found 14425 articles, been with the rise of publication in this area. This update confirmed the impressions of Colantonio *et al.*⁵⁶ in 2004, who wrote *“These numbers suggest that the application of clinical proteomic research is growing rapidly in the field of biomarker discovery”*.

8. Saliva as a potential source of disease biomarkers

Many diseases could be better understood by advances in proteomics. Saliva is an excellent medium in which to detect disease biomarkers because it is easy and painless to collect, and contains proteins rich in information about diseases process.

Saliva is an important fluid that lubricates oral mucosa and ingested food, protects and maintains tissue integrity, neutralizes acids from bacteria and food, and cleans the oral cavity (Fig. 3)^{14,47,57}. Whole saliva derives from major salivary glands comprising two parotid, two submandibular, and two sublingual glands; minor salivary glands; and crevicular fluid, in total producing between 600 and 12,000 mL/day⁵⁸. Saliva is an exocrine secretion that can be divided into mucous and serous components. The parotid gland secretes only serous component, the submandibular gland secretes a mixture of mucous and serous components, while the sublingual and minor glands secrete only mucous components^{57,59}.

Use of saliva is attractive for monitoring health and disease because its collection, is non-invasive, easy, and painless, and does not require special training. Recent advances in proteomics enables it to qualitatively and quantitatively determine the protein composition of saliva⁵⁸. Indeed, In the last decade, advances in saliva research have identified many proteins as potential systemic biomarkers for endocrine function, stress and psychological state, exposure to infectious agents, use or metabolism of drugs or other xenobiotics, and cancers⁵⁹.

Siqueira and Dawes⁶ illustrated how saliva is better than plasma for detection of biomarkers: while the 22 most abundant proteins in plasma make up 99% of the total plasma protein content, making identification of the remainder of the 2676 serum proteins a challenge, the 20 most abundant salivary proteins make up only 40% of the total salivary protein content, facilitating ease of detection of biomarkers from the remaining 60% of proteins.

More studies are needed to compare healthy and diseased salivary proteomes. While Khurshid *et al.*¹ demonstrated that approximately “30% of proteomic studies of saliva explored the proteome during oral pathological conditions such as caries, periodontitis, gingivitis, dental abscess, endodontic lesions, and oral carcinomas”, there are few studies of the salivary proteome under normal conditions that would provide a gold standard reference for other studies, principally of oral disease conditions.

Most studies have used whole saliva instead of specific glandular secretions to discover possible oral biomarkers. Because whole saliva is composed of glandular secretions (95.6%) mixed with gingival fluid (2.4%), microorganisms (1%), and epithelial host cells (1%), samples may contain additional proteins

from, for example, gingival inflammation discharge. Isolated glandular secretions obtained through cannulation of major gland ducts may prove better for biomarker detection, avoiding the influence of the other whole saliva components⁶.

Nevertheless, many studies reports use of oral fluids such as whole saliva for early detection and monitoring of diseases. We used the terms “saliva” and “proteomic” to search PubMed and Google Scholar for such studies, summarizing 16 highly-cited articles according to citations in Google Scholar in Table 1. The number of publications per year for “saliva” and “proteomic” (based on <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>) is shown in Fig. 4.

Table 1: Highly-cited articles on disease detection using salivary proteomics

Year	Author	Salivary proteomics application	Results
2007	Hu et al. ¹⁴	Detection of oral cancer and Sjögren syndrome	Slight advantage over serum in detection
2007	Giusti et al. ⁶⁰	Detection of Sjögren syndrome	Proteomics may be useful in diagnosis of connective tissue disorders
2008	Hu et al. ⁶¹	Detection of oral cancer	Promising approach to searching for oral cancer biomarkers
2009	Wu et al. ⁶²	Detection of gastric cancer	Promising approach for early clinical diagnosis of gastric cancer
2009	Wu et al. ⁶³	Profile of generalized aggressive periodontitis	Proteome analysis may contribute to understanding the etiology of aggressive periodontitis
2009	Yan et al. ⁶⁴	Systematic comparison of the human saliva and plasma proteomes	High similarity between saliva and plasma proteomes
2010	de Jong et al. ⁶⁵	Detection of oral cancer	Promising detection method for oral cancer
2010	Wu et al. ⁶⁶	Potential biomarkers in saliva for oral squamous cell carcinoma	Salivary screening can be the best option for primary screening of high-risk cases of oral cancer
2010	Gonçalves et al. ⁶⁷	Analysis of chronic periodontitis patients	Proteome analysis may contribute to the improvement of periodontal diagnosis
2011	Castagnola et al. ⁵⁹	Potential applications of human saliva as a diagnostic fluid	A proteomic analysis approach may be useful in diagnosis of head and neck cancers, breast and gastric cancers, salivary gland function and disease, Sjögren syndrome, systemic sclerosis, dental and gingival pathology, systemic, psychiatric, and neurological diseases
2011	Xiao et al. ⁶⁸	Biomarkers discovery in human saliva	Found salivary proteomic biomarkers for oral cancer, Sjögren syndrome and breast cancer
2012	Xiao et al. ⁶⁹	Detection of lung cancer	Proteomic biomarkers are present in human saliva when people develop lung cancer
2012	Ambatipudi et al. ⁷⁰	Detection of primary Sjögren syndrome	Proteome analysis improved and provided early diagnosis of primary Sjögren syndrome
2013	Amado et al. ⁴⁰	Overview of the major achievements in saliva proteomics	Identified protein markers for chronic periodontitis, gingivitis, head and neck squamous cell carcinoma, non-invasive breast cancer, rheumatoid arthritis, periodontitis, aggressive periodontitis, dental caries, Sjögren syndrome, lung cancer, type 2 diabetes in the elderly, orthodontic treatment, pre-malignant and malignant lesions, gastric cancer, periodontitis with obesity, oral leukoplakia, type 1 diabetes,
2013	Martins et al. ⁷¹	Systematic review of salivary proteins as biomarkers for dental caries	Lack of sufficient evidence to establish salivary proteins as a biomarker for this disease
2017	Zuanazzi et al. ⁷²	Postnatal identification of Zika virus peptides from saliva	Possibility of non-invasive sampling of saliva for subsequent large-scale screening for Zika virus infection

Many authors believe that comprehensive characterization of human saliva is an important step toward the clinical application of salivary proteomics for the diagnosis and prognosis of diseases.

Conclusion

In this review we have highlighted how salivary proteomic analysis has broad practical promise and application for easy and painless diagnosis of diseases. The review also outlined to the general dentist a step-by-step summary of how salivary proteomics can be used for diagnosis, and search for biomarkers. Despite salivary proteomics being a relatively new area of research, recent advances, and the increase in published studies, demonstrate the great potential of saliva as a diagnostic fluid.

Acknowledgements

The authors acknowledge the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior/CAPES for the research grants (PDSE – Edital nº19/2016.).

References

1. Khurshid Z, Zohaib S, Najeeb S, Zafar M, Rehman R, Rehman I. Advances of Proteomic Sciences in Dentistry. *Int J Mol Sci.* 2016 May 13;17(12):728.
2. Maron JL. Salivary Diagnostics in Pediatrics : Applicability , Translatability , and Limitations. 2017;5(April):1–8.
3. Nelson DL, Cox MM. *Lehninger principles of biochemistry* 5 edition WH Freeman and Company. New York, NY. 2008;
4. Breda A, Valadares NF, de Souza ON, Garratt RC. *Protein structure, modelling and applications.* 2007;
5. Crick FHC. On protein synthesis. In: *Symp Soc Exp Biol.* 1958. p. 8.
6. Siqueira WL, Dawes C. The salivary proteome: challenges and perspectives. *PROTEOMICS-Clinical Appl.* 2011;5(11-12):575–9.
7. Wilkins MR, Sanchez J-C, Gooley AA, Appel RD, Humphery-Smith I, Hochstrasser DF, et al. Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnol Genet Eng Rev.* 1996;13(1):19–50.
8. Wasinger VC, Cordwell SJ, Cerpa-Poljak A, Yan JX, Gooley AA, Wilkins MR, et al. Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium.* *Electrophoresis.* 1995;16(1):1090–4.
9. Barbosa EB, Vidotto A, Polachini GM, Henrique T, de Marqui ABT, Tajara EH. Proteomics: methodologies and applications to the study of human diseases. *Rev da Assoc Médica Bras (English Ed.* 2012;58(3):366–75.

10. Mrowka R, Patzak A, Herzel H. Is there a bias in proteome research? *Genome Res.* 2001;11(12):1971–3.
11. Irene Messana †, Tiziana Cabras †, Rosanna Inzitari ‡, Alessandro Lupi §, Cecilia Zuppi ‡, Chiara Olmi ‡, et al. Characterization of the Human Salivary Basic Proline-Rich Protein Complex by a Proteomic Approach. 2004;
12. Bogdanov B, Smith RD. Proteomics by FTICR mass spectrometry: Top down and bottom up. *Mass Spectrom Rev.* 2005 Mar;24(2):168–200.
13. Cabras T, Iavarone F, Manconi B, Olianias A, Sanna MT, Castagnola M, et al. Top-down analytical platforms for the characterization of the human salivary proteome. *Bioanalysis.* 2014;6(4).
14. Hu S, Loo JA, Wong DT. Human saliva proteome analysis. *Ann N Y Acad Sci.* 2007;1098:323–9.
15. Aslam B, Basit M, Nisar MA, Khurshid M, Rasool MH. Proteomics: Technologies and Their Applications. *J Chromatogr Sci.* 2016 Feb;55(2):182–96.
16. Washburn MP, Wolters D, Yates 3rd JR. Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. *Nat Biotechnol.* 2001/03/07. 2001;19(3):242–7.
17. Dowsey AW, Dunn MJ, Yang GZ. The role of bioinformatics in two-dimensional gel electrophoresis. *Proteomics.* 2003/08/19. 2003;3(8):1567–96.
18. Weiss W, Weiland F, Görg A. Protein detection and quantitation technologies for gel-based proteome analysis. *Proteomics Methods Protoc.* 2009;59–82.
19. Görg A, Weiss W, Dunn MJ. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics.* 2004;4(12):3665–85.
20. May C, Brosseron F, Chartowski P, Schumbrutzki C, Schoenebeck B, Marcus K. Instruments and Methods in Proteomics. In Humana Press; 2011. p. 3–26.
21. Mahmood T, Yang P-C. Western blot: technique, theory, and trouble shooting. *N Am J Med Sci.* 2012 Sep;4(9):429–34.
22. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1979 Sep;76(9):4350–4.
23. Aebersold R, Mann M. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature.* 2003;422(6928):198–207.
24. Nguyen S, Fenn JB. Gas-phase ions of solute species from charged droplets of solutions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Jan 23;104(4):1111–7.
25. Chait BT. Mass Spectrometry in the Postgenomic Era. *Annu Rev Biochem.* 2011 Jul 7;80(1):239–46.
26. Hernandez P, Müller M, Appel RD. Automated protein identification by tandem mass spectrometry: Issues and strategies. *Mass Spectrom Rev.* 2006;25(2):235–54.
27. Hrabák J, Chudácková E, Walková R. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight (maldi-tof) mass spectrometry for detection of antibiotic resistance mechanisms: from research to routine diagnosis. *Clin Microbiol Rev.* 2013 Jan 1;26(1):103–14.

28. Barbosa EB, Vidotto A, Polachini GM, Henrique T, Trovó de Marqui AB, Tajara EH. Proteômica: metodologias e aplicações no estudo de doenças humanas. *Rev Assoc Med Bras*. 2012 May;58(3):366–75.
29. Perkins DN, Pappin DJC, Creasy DM, Cottrell JS. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis*. 1999 Dec 1;20(18):3551–67.
30. Niessen WMA. MS–MS and MSn. In: *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry*. Elsevier; 1999. p. 1675–81.
31. Cottrell JS. Protein identification using MS/MS data. *J Proteomics*. 2011 Sep 6;74(10):1842–51.
32. Zhang W, Zhao X. Method for rapid protein identification in a large database. *Biomed Res Int*. 2013;2013:414069.
33. Wenger CD, Coon JJ. A proteomics search algorithm specifically designed for high-resolution tandem mass spectra. *J Proteome Res*. 2013 Mar 1;12(3):1377–86.
34. Pappin DJ, Hojrup P, Bleasby AJ. Rapid identification of proteins by peptide-mass fingerprinting. *Curr Biol*. 1993 Jun 1;3(6):327–32.
35. Koenig T, Menze BH, Kirchner M, Monigatti F, Parker KC, Patterson T, et al. Robust Prediction of the MASCOT Score for an Improved Quality Assessment in Mass Spectrometric Proteomics. *J Proteome Res*. 2008 Sep 5;7(9):3708–17.
36. Eng JK, McCormack AL, Yates JR. An Approach to Correlate Tandem Mass Spectral Data of Peptides with Amino Acid Sequences in a Protein Database.
37. Downloadable data - The Human Protein Atlas [Internet]. [cited 2018 Mar 23]. Available from: <https://www.proteinatlas.org/about/download>
38. Uhlen M, Fagerberg L, Hallstrom BM, Lindskog C, Oksvold P, Mardinoglu A, et al. Tissue-based map of the human proteome. *Science* (80-). 2015 Jan 23;347(6220):1260419–1260419.
39. Bandhakavi S, Stone MD, Onsongo G, Van Riper SK, Griffin TJ. A dynamic range compression and three-dimensional peptide fractionation analysis platform expands proteome coverage and the diagnostic potential of whole saliva. *J Proteome Res*. 2009 Dec;8(12):5590–600.
40. Amado FMLL, Ferreira RP, Vitorino R. One decade of salivary proteomics: Current approaches and outstanding challenges. *Clin Biochem*. 2013 Apr 1;46(6):506–17.
41. Hu S, Xie Y, Ramachandran P, Ogorzalek Loo RR, Li Y, Loo JA, et al. Large-scale identification of proteins in human salivary proteome by liquid chromatography/mass spectrometry and two-dimensional gel electrophoresis-mass spectrometry. *Proteomics*. 2005 Apr;5(6):1714–28.
42. Vitorino R, Lobo MJC, Ferrer-Correia AJ, Dubin JR, Tomer KB, Domingues PM, et al. Identification of human whole saliva protein components using proteomics. *Proteomics*. 2004 Apr;4(4):1109–15.
43. Frenkel ES, Ribbeck K. Salivary mucins in host defense and disease prevention. *J Oral Microbiol*. 2015;7:29759.
44. Ma J, Rubin BK, Voynow JA. Mucins, Mucus, and Goblet Cells. *Chest*. 2017 Nov 21;0(0).

45. Chen Y, Zhao YH, Kalaslavadi TB, Hamati E, Nehrke K, Le AD, et al. Genome-Wide Search and Identification of a Novel Gel-Forming Mucin *MUC19/Muc19* in Glandular Tissues. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2004 Feb 20;30(2):155–65.
46. Bennick A. Salivary proline-rich proteins. *Mol Cell Biochem*. 1982 Nov;45(2):83–99.
47. Khurshid Z, Zohaib S, Najeeb S, Zafar M, Slowey P, Almas K. Human Saliva Collection Devices for Proteomics: An Update. *Int J Mol Sci*. 2016 Jun 6;17(12):846.
48. Albicans C, Oppenheirnsb FG, Xu T, Mcmillians FM, Levitzli SM, Diamondl RD, et al. Histatins, a Novel Family of Histidine-rich Proteins in Human Parotid Secretion. 1988;
49. Siqueira WL, Margolis HC, Helmerhorst EJ, Mendes FM, Oppenheim FG. Evidence of Intact Histatins in the *in vivo* Acquired Enamel Pellicle. *J Dent Res*. 2010 Jun 29;89(6):626–30.
50. Moffa EB, Machado MAAM, Mussi MCM, Xiao Y, Garrido SS, Giampaolo ET, et al. In Vitro Identification of Histatin 5 Salivary Complexes. Kniemeyer O, editor. *PLoS One*. 2015 Nov 6;10(11):e0142517.
51. Siqueira WL, Lee YH, Xiao Y, Held K, Wong W. Identification and characterization of histatin 1 salivary complexes by using mass spectrometry. *Proteomics*. 2012 Nov;12(22):3426–35.
52. Loo JA, Yan W, Ramachandran P, Wong DT. CRITICAL REVIEWS IN ORAL BIOLOGY & MEDICINE. *J Dent Res*. 2010;89(10):1016–23.
53. Boehlke C, Zierau O, Hannig C. Salivary amylase – The enzyme of unspecialized euryphagous animals. *Arch Oral Biol*. 2015 Aug 1;60(8):1162–76.
54. Keller PJ, Kauffman DL, Allan BJ, Williams BL. Structural differences between the isoenzymes of human parotid α -amylase. *Biochemistry*. 1971 Dec;10(26):4867–74.
55. Crosara KTB, Zuanazzi D, Moffa EB, Xiao Y, Machado MA de AM, Siqueira WL. Revealing the Amylase Interactome in Whole Saliva Using Proteomic Approaches. *Biomed Res Int*. 2018 Jan 31;2018:1–15.
56. Colantonio DA, Chan DW. The clinical application of proteomics. *Clin Chim Acta*. 2005 Jul 24;357(2):151–8.
57. Proctor GB, Carpenter GH. Salivary secretion: mechanism and neural regulation. *Monogr Oral Sci*. 2014;24:14–29.
58. Wong D. Salivary diagnostics. Wiley-Blackwell; 2008. 301 p.
59. Castagnola M, Picciotti PM, Messana I, Fanali C, Fiorita A, Cabras T, et al. Potential applications of human saliva as diagnostic fluid. *Acta Otorhinolaryngol Ital*. 2011;31(6):347–57.
60. Giusti L, Baldini C, Bazzich L, Ciregia F, Tonazzini I, Mascia G, et al. Proteome analysis of whole saliva: A new tool for rheumatic diseases - The example of Sjögren's syndrome. *Proteomics*. 2007;7(10):1634–43.
61. Hu S, Arellano M, Boontheung P, Wang J, Zhou H, Jiang J, et al. Salivary proteomics for oral cancer biomarker discovery. *Clin Cancer Res*. 2008;14(19):6246–52.
62. Wu ZZ, Wang JG, Zhang XL. Diagnostic model of saliva protein finger print analysis of patients with gastric cancer. *World J Gastroenterol*. 2009;15(7):865–70.

63. Wu Y, Shu R, Luo LJ, Ge LH, Xie YF. Initial comparison of proteomic profiles of whole unstimulated saliva obtained from generalized aggressive periodontitis patients and healthy control subjects. *J Periodontal Res.* 2009;44(5):636–44.
64. Yan W, Apweiler R, Balgley BM, Boontheung P, Bundy JL, Cargile BJ, et al. Systematic comparison of the human saliva and plasma proteomes. *Proteomics - Clin Appl.* 2009;
65. de Jong EP, Xie H, Onsongo G, Stone MD, Chen XB, Kooren JA, et al. Quantitative proteomics reveals myosin and actin as promising saliva biomarkers for distinguishing pre-malignant and malignant oral lesions. *PLoS One.* 2010;5(6).
66. Wu JY, Yi C, Chung HR, Wang DJ, Chang WC, Lee SY, et al. Potential biomarkers in saliva for oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 2010;46(4):226–31.
67. Gonçalves LDR, Soares MR, Nogueira FCS, Garcia C, Camisasca DR, Domont G, et al. Comparative proteomic analysis of whole saliva from chronic periodontitis patients. *J Proteomics.* 2010;73(7):1334–41.
68. Xiao H, Wong DT. Proteomics and its applications for biomarker discovery in human saliva. *Bioinformation.* 2011;5(7):294–6.
69. 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.
70. Ambatipudi KS, Swatkoski S, Moresco JJ, Tu PG, Coca A, Anolik JH, et al. Quantitative proteomics of parotid saliva in primary Sjögren's syndrome. *Proteomics.* 2012;12(19–20):3113–20.
71. Martins C, Buczynski AK, Maia LC, Siqueira WL, Castro GFBDA. Salivary proteins as a biomarker for dental caries-A systematic review. *J Dent.* 2013;41(1):2–8.
72. Zuanazzi D, Arts EJ, Jorge PK, Mulyar Y, Gibson R, Xiao Y, et al. Postnatal Identification of Zika Virus Peptides from Saliva. *J Dent Res.* 2017;96(10):1078–84.

Figure 1A : Ionization methods - MALDI: the peptides are crystallizing into an organic matrix and are ionization by laser.

Figure 1B: Ionization methods - ESI: The aqueous solution containing the analyte is forced through a capillary needle which upon evaporation of the solvent generates ionized form

Figure 2: Tandem Mass Spectrometry steps

Figure 3: Saliva functions in the oral cavity

Figure 4: Publications numbers increase according to advantages in proteomics technique, increasing the possibility of discovering new diseases biomarkers. The rose in number was at 2012 with 75 new published studies in saliva area.

APÊNDICE B – Proteínas encontradas nos artigos

Autor	Gene	Proteínas	Número de Acesso
Neyraud et al. 2006 ²³	Supplementary file		
Wu et al. 2014 ²⁶	STATH	*	P02808
	ACBD3	*	Q9H3P7
Parotid/Sublingual/	CST4	*	P01036
Submandibular	CST2	*	P09228
	SMR3B	*	P02814
	SMR3B	*	P02814
	SMR3B	*	P02814
	PRH1	*	P02810
	STATH	*	P02808
	SMR3B	*	P02814
	SMR3B	*	P02814
	STATH	*	P02808
	CST1	*	P01037
	SMR3B	*	P02814
	HTNI	*	PI 5515
	HTN1	*	P15515
	HTN1	*	P15515
	HTNI	*	P15515
	SMR3B	*	P02814
	CST4	*	P01036
	CST4	*	P01036
	STATH	*	P02808
	SMR3B	*	P02814
	HTN1	*	P15515
	HTN1	*	P15515
	PRH1	*	P02810
	PRH1	*	P02810
	SMR3B	*	P02814
	PRH1	*	P02810
	SMR3B	*	P02814
	CST1	*	P01037
	SMR3B	*	P02814
	STATH	*	P02808
	PRH1	*	P02810
	PRH1	*	P02810
	PRH1	*	P02810
	PRH1	*	P02810

	PRH1	*	P02810
	PRH1	*	P02810
	PRH1	*	P02810
	PRH1	*	P02810
	PRH1	*	P02810
	PRH1	*	P02810
	PRB2	*	P02812
	STATH	*	P02808
	PRB2	*	P02812
	PRB2	*	P02812
	PRB2	*	P02812
	PRB4	*	P10163
	PRB2	*	P02812
		*	
Laheij et al. 2015 ²⁷	14-3-3 protein sigma		P31947
	Alpha-1-antichymotrypsin		P01011
Parotid	Antileukoproteinase		P03973
	Basic salivary proline-rich protein 1		P04280
	Basic salivary proline-rich protein 4		P10163
	Beta-2-microglobulin		P61769
	Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1		P13688
	CD59 glycoprotein		P13987
	Clusterin		P10909
	Cystatin-C		P01034
	Cystatin-SA		P09228
	Cystatin-SN		P01037
	Dermcidin		P81605
	Elafin		P19957
	Extracellular matrix protein 1		Q16610
	Extracellular superoxide dismutase [Cu-Zn]		P08294
	Fibronectin		P02751
	Follicular dendritic cell secreted peptide		Q8NFU4
	Galectin-7		P47929
	Granulins		P28799
	Haptoglobin		P00738
	Histatin-1		P15515
	Histatin-3		P15516
	Immunoglobulin J chain		P01591
	Immunoglobulin lambda-like polypeptide 1		P15814
	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4		Q14624
	Interleukin-1 receptor antagonist protein		P18510
	Interleukin-36 gamma		Q9NZH8
	Kallikrein-11		Q9UBX7
	Kallikrein-12		Q9UKR0
	Kallikrein-6		Q92876
	Kallikrein-7		P49862

	Lactotransferrin	P02788
	Lysozyme C	P61626
	Matrilysin	P09237
	Mesothelin	Q13421
	Neuroendocrine secretory protein 55	O95467
	Neutrophil defensin 1	P59665
	Neutrophil gelatinase-associated lipocalin	P80188
	Peptidoglycan recognition protein 1	O75594
	Plasminogen	P00747
	Proline-rich protein 4	Q16378
	Protein CREG1	O75629
	Protein FAM3B	P58499
	Protein S100-A7	P31151
	Protein S100-A8	P05109
	Protein S100-A9	P06702
	Prothrombin	P00734
	Retinol-binding protein 4	P02753
	Ribonuclease pancreatic	P07998
	Ribonuclease T2	O00584
	Salivary acidic proline-rich phosphoprotein 1/2	P02810
	Serpin B5	P36952
	Submaxillary gland androgen-regulated protein 3A	Q99954
	Submaxillary gland androgen-regulated protein 3B	P02814
	Thioredoxin	P10599
	Transmembrane protease serine 11 D	O60235
	Trypsin- 1	P07477
	Trypsin-3	P35030
	Uncharacterized protein C4orf4O	Q6MZM9
	Uteroglobin	P11684
	Vitronectin	P04004
	von Willebrand factor A domain-containing protein 1	Q6PCBO
	WAP four-disulfide core domain protein 2	Q14508
	Zymogen granule protein 16 homolog B	Q96DAO
Hardt et al. 2005 ²⁰	poly Ig receptor	P01833
	serum albumin	P02768
Parotid	Zn-alfa-2-glycoprotein	P25311
	carbonic anhydrase VI	P23280
	carbonic anhydrase VI	P23280
	histatin 1	P15515
	cystatin B	P04080
	histatin I	P15515
	cystatin SA	P09228
	PRP-C phosphoprotein	P02810
	PRP-C phosphoprotein	P02810
	PRP-C phosphoprotein	P02810

		Ig κ chain C isoform	P01834
		Ig α-1 chain isoform	P01876
		Ig κ chain C isoform	P01834
		Ig α-1 chain isoform	P01876
		secretory actin-binding protein	P12273
		cystatin D	P28325
		Zn-α-2-glycoprotein	P25311
		Zn-α-2-glycoprotein	P25311
		po1y 1g receptor	P01833
		histatin 3	P15516
		Ig κ chain C isoform	P01834
		lysozyme C	P00695
		histatin 6	P15516
		PRG or G 1 proline rich glycoprotein	NP_006240
		serum albumin	P02768
Ryu et al. 2006 ²²		Lactoferrin	
		Beta2-Microglobulin	
Parotid gland		Polymeric Ig receptor	
SS		Carbonic anhydrase VI	
		Lysozyme C	
		Ig k light chain	
		Salivary amylase	
		Cystatin C	
Denny et al. 2008 ²⁴	Supplementary file		
D. Preza et al. 2009 ²⁵	ACTB	Actin	
	A1AG1	Alpha-1 -acid glycoprotein 1	
Parotid gland	AMY1	Alpha-amylase	
Root Caries	ANXA1	Annexin A1	
	CAH6	Carbonic anhydrase 6	
	CATD	Cathepsin D	
	CH3L2	Chitinase 3-like protein 2	
	GLUS	Clusterin	
	CO6A1	Collagen alpha-1 (VI) chain	
	G06A2	Collagen alpha-2 (VI) chain	
	G03	Complement C3	
	CYTA	Cystatin-A	
	CYTB	Cystatin-B	
	CYTC	Cystatin-C	
	CYTD	Cystatin-D	
	CYTS	Cystatin-S	
	CYTT	Cystatin-SA	
	GYTN	Cystatin-SN	
	K1C13	Cytokeratin-13	

K1C14	Cytokeratin-14
K1C16	Cytokeratin-16
K1C17	Cytokeratin-17
K22E	Cytokeratin-2e
K2C3	Cytokeratin-3
K2C4	Cytokeratin-4
K2C5	Cytokeratin-5
K2C6A	Cytokeratin-6A
DMBT1	Deleted in malign. brain tumors 1
DCD	Dermcidin
LG3BP	Galectin-3-binding protein
GRP78	Glucose-regulated protein-78 kDa
GSTP1	Glutathione S-transferase P
G3P	Glyceraldehyde-3-ph. dehydrog.
HBB	Hemoglobin subunit beta
H4	Histone H4
IGHA1	Ig alpha-1 chain C region
IGHA2	Ig alpha-2 chain C region
HV30S	Ig heavy chain V-III region BRO
KAC	Ig kappa chain C region
KV1O1	Ig kappa chain V-I region AG
KV1O4	Ig kappa chain V-I region CAR
KV2O1	Ig kappa chain V-II regionCum
KV3O2	Ig kappa chain V-III region SIE
KV4O1	Ig kappa chain V-IV region
KV4O2	Ig kappa chain V-IV region LEN
LV105	Ig lambda ch. V-I region NEWM
LAC	Ig lambda chain C region
LV106	Ig lambda ch. V-I region NEW
LV302	Ig lambda ch. V-III region SIE
MUC	Ig mu chain C region
IGJ	Immunoglobulin J chain
KLK1	Kallikrein-1
PERL	Lactoperoxidase
TRFL	Lactotransferrin
LYSC	Lysozyme C
NGAL	Neutrophil gelatinase a. lipocalin
SPLC2	Parotid secretory protein 2
PIIB	Peptidylprolyl cis-transisomeraseB
PRDX1	Peroxisredoxin-1
PLTP	Phospholipid transfer protein
PIGR	Polymeric—immunoglobulin rec.
PIP	Prolactin—inducible protein
U773	Protein UNQ 773/PRO1567
RNT2	Ribonuclease T2
TRFE	Serotransferrin

	ALBU	Serum albumin
	SPRR3	Small proline-rich protein 3
	SPRL1	SPARC-like protein 1
	TSPI	Thrombospondin-1
	TCO1	Transcobalamin-1
	TGM3	Transglutaminase 3
	TPP I	Tripeptidyl-peptidase 1
	ZA2G	Zinc-alpha-2-glycoprotein
Walz et al. 2006 ²³		Actin
		Calgranulin A
Parotid/Submandibular		Calgranulin B
Sublingual		Carbonic anhydrase VI
		Chain B, D human Zn-alpha2-glycoprotein
		Cyclophilin B
		Cystatin B
		Cystatin C
		Cystatin D
		Cystatin SA-III precursor of acquired enamel pellicle
		Cystatin SA
		Cystatin SN precursor
		Cytokeratin 1
		Enolase 1
		Human salivary amylase
		Ig alpha-1 chain C region
		Keratin 10
		Lactoferrin
		Parotid secretory protein
		Phosphoglycerate kinase
		Poly-Ig-receptor
		Prolactin-inducible protein
		Proline-rich phosphoprotein (gene PRH1 Db allele)
		PRP BstNI, subfamily 1, isoform 3
		PRP BstNI, subfamily 3 (PRG)
		Prolyl-4-hydroxylase
		Serum albumin
		Thioredoxin
		Transferrin
		HSPCO59
		Ig alpha-2 heavy chain
		Ig k light chain VU region
		Lactoperoxidase, salivary peroxidase
		Salivary acidic proline-rich phosphoprotein 1/2 precursor
		CST1
		Cystatin S
		Histatin 1

Mucin 7

0808206A peptide PA, proline-rich peptide

Hall et al. 2017²⁹

histone H4	P62805
histone H2A type 2-A	Q6FI13
histone H2B type 2-F	QSQNW6
histone H3.2	Q71D13
beta-2-microglobulin	P61769
annexin A1	P04083
galectin-3-binding protein	Q08380
BPI fold-containing family A member	Q96DR5
isoform 2 of carbonic anhydrase 6	P23280-2
carbonic anhydrase 6	P23280
BPI fold-containing family A member 2	Q96DR5
BPI fold-containing family B member 2	Q8N4F0
BPI fold-containing family B member 1	Q8TDL5
histone H2A type 2-A	Q6FI13
1g gamma-1 chain C region	P01857
envoplakin	Q92817
histone H4	P62805
chitinase-3-like protein 2	Q15782
involucrin	P07476
14-3-3 protein zeta/delta	P63104
myeloperoxidase	P05164
kallikrein-1	P06870
1g alpha-2 chain C region	P01877
BPI fold-containing family A member 2	Q96DR5
carbonic anhydrase 6	P23280
isoform 2 of carbonic anhydrase 6	P23280-2
histatin-1	P15515
polymeric immunoglobulin receptor	P01833
Ig alpha-1 chain C region	P01876
Ig alpha-2 chain C region	P01877
lactotransferrin	P02789
Ig mu heavy chain disease protein	P04220
lactoperoxidase	P22079
zinc-alpha-2-glycoprotein	P25311
galectin-3-binding protein	Q08380
alpha-amylase 1	P04745
haptoglobin	P00738
metalloproteinase inhibitor 1	P01033
Ig mu chain C region	P01871
serotransferrin	P02787
hemopexin	P02790
myeloperoxidase	P05164
clusterin	P10909

keratin, type I cytoskeletal 13	P13646
transcobalamin-1	P20061
desmoglein-3	P32926
neutrophil gelatinase-associated lipocalin	P80188
desmoglein- 1	Q02413
desmocollin-2	Q02487
mucin-5B	Q9HC84
deleted in malignant brain tumors 1	Q9UGM3
IgGfc-binding protein	Q9Y6R7
kallikrein-1	P06870
BPI fold-containing family B member 2	Q8N4F0
alpha-1-antitrypsin	P01009

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: Avaliação proteômica da composição salivar de pacientes com transtornos alimentares, refluxo gastroesofágico: um estudo caso controle.

Pesquisador: Celso Lemos

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 56130916.5.0000.0075

Instituição Proponente: Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.556.125

Apresentação do Projeto:

Será um estudo transversal, no qual serão avaliados 150 pacientes, destes 50 com DRGE, 50 com TAs e 50 controles saudáveis. Os pacientes responderão a um questionário elaborado pela pesquisadora e a um questionário socioeconômico, em seguida serão submetidos ao exame clínico inicial, para avaliação geral da saúde bucal, com enfoque na presença de lesões na mucosa. Também passarão por uma profilaxia prévia para avaliação da erosão dental. Também será coletada saliva para a avaliação de fluxo salivar e o conteúdo será armazenado em freezer -80°C para avaliação proteômica. Será feita a análise descritiva de todas as variáveis do estudo.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

O objetivo específico deste estudo será avaliar nos pacientes com DRGE e TAs: A. Características socioeconômicas; B. Xerostomia e fluxo salivar; C. Condição sistêmica dos pacientes através de um procedimento menos invasivo, que não gera estímulos dolorosos e ansiedades, comuns em exames de coleta de sangue; D. Composição salivar dos pacientes afetados com constante

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 05.508-900

UF: SP

Município: SÃO PAULO

Telefone: (11)3091-7960

Fax: (11)3091-7814

E-mail: cepfo@usp.br

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE SÃO

Continuação do Parecer: 1.556.125

ataque ácido seja diferente e que haja marcadores específicos nos indivíduos afetados; E. Avaliar se a ingestão de medicamentos com potencial xerostômico pode interferir na síntese de Mucina.

Objetivo Secundário:

Montar um painel de proteínas dos pacientes e comparar estas proteínas com o controle intra indivíduo e inter indivíduos, com o intuito de identificar proteínas existentes ou não, sendo assim, encontrando um possível marcador oral para DRGE e TAs.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos e desconfortos envolvidos nessa pesquisa são mínimos, pois envolvem a realização de um questionário, exame bucal, exame de fluxo salivar com coleta de saliva.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Bem desenhada e importante, com os documentos necessários apresentados adequadamente.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os documentos apresentados e o TCLE corrigido.

Recomendações:

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP-FOUSP relatórios parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final, utilizando-se da opção "Enviar Notificação" (descrita no Manual "Submeter Notificação", disponível na Central de Suporte - canto superior direito do site www.saude.gov.br/plataformabrasil).

Qualquer alteração no projeto original deve ser apresentada "emenda" a este CEP, de forma objetiva e com justificativas para nova apreciação.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_709448.pdf	16/05/2016 14:56:03		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento /	Anexo_A_TCLE_16_05_2016.pdf	16/05/2016 14:55:05	Camilla Vieira Esteves dos Santos	Aceito

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 05.508-900

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3091-7960

Fax: (11)3091-7814

E-mail: cepfo@usp.br

**FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO**

Continuação do Parecer: 1.556.125

Justificativa de Ausência	Anexo_A_TCLE_16_05_2016.pdf	16/05/2016 14:55:05	Camilla Vieira Esteves dos Santos	Aceito
Orçamento	Orcamento.pdf	12/05/2016 23:11:18	Camilla Vieira Esteves dos Santos	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Completo_12_05_2016.pdf	12/05/2016 11:36:21	Camilla Vieira Esteves dos Santos	Aceito
Outros	Anexo_F_Questionario.pdf	11/05/2016 22:19:16	Camilla Vieira Esteves dos Santos	Aceito
Outros	Carta_autorizacao_clinica.pdf	11/05/2016 20:35:23	Camilla Vieira Esteves dos Santos	Aceito
Folha de Rosto	PB_Brasil.pdf	11/05/2016 20:32:26	Camilla Vieira Esteves dos Santos	Aceito
Cronograma	Cronograma.pdf	10/05/2016 14:43:29	Camilla Vieira Esteves dos Santos	Aceito
Outros	Anexo_E_Questionario.pdf	10/05/2016 14:37:08	Camilla Vieira Esteves dos Santos	Aceito
Outros	Anexo_D_Questionario.pdf	10/05/2016 14:34:16	Camilla Vieira Esteves dos Santos	Aceito
Outros	Anexo_C_Questionario.pdf	10/05/2016 14:32:56	Camilla Vieira Esteves dos Santos	Aceito
Outros	Anexo_B_Questionario.pdf	10/05/2016 14:29:38	Camilla Vieira Esteves dos Santos	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 20 de Maio de 2016

**Assinado por:
Décio dos Santos Pinto Junior
(Coordenador)**

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 05.508-900

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3091-7960

Fax: (11)3091-7814

E-mail: cepfo@usp.br

ANEXO B – Parecer Consubstanciado do Comitê em Pesquisa (CAPPesq) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação proteômica da composição salivar de pacientes com transtornos alimentares, refluxo gastroesofágico: um estudo caso controle.

Pesquisador: Celso Lemos

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 56130916.5.3001.0068

Instituição Proponente: Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.928.531

Apresentação do Projeto:

É um consenso que a mucosa oral é um bom marcador para se entender a saúde geral de um indivíduo, pois muitas doenças sistêmicas, como doença do refluxo gastroesofágico (DRGE) e os transtornos alimentares (TAs), possuem sua manifestação na cavidade oral, antes mesmo das manifestações corpóreas. A DRGE bem como os demais sintomas oriundos do sistema digestório superior afetam grande parte da população ocidental, ainda que suas complicações não sejam frequentes, constituem-se tema de relevância nas questões de saúde pública. Os TAs são um grupo de desordens, que afetam a relação do paciente com a comida e sua percepção corpórea, podendo levar a uma visão distorcida da própria aparência (Lo Russo et al., 2008), o que pode levar a práticas de autoindução de vômito, uso de laxantes, diuréticos ou outros medicamentos para compensar o ganho de peso. A queda do pH salivar abaixo de 5,5 é potencialmente destrutivo para as estruturas duras (esmalte e dentina) e para os tecidos moles. O organismo na tentativa de reverter esse processo para diminuir os danos e manter o pH bucal por volta de 6,8, utiliza três sistemas de capacidade tampão: o fosfato, bicarbonato e proteínas. Os pacientes com DRGE e TAs tem este controle da capacidade tampão prejudicado, devido ao contato constante de ácido originado pelo refluxo gastroesofágico e nos quadros de TAs em que há autoindução de vômito frequente. Em um

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar

Bairro: Cerqueira Cesar

CEP: 05.403-010

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)2661-7585

Fax: (11)2661-7585

E-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br

Continuação do Parecer: 1.928.531

estudo realizado com a população brasileira portadora de DRGE, obteve como resultados maior incidência de erosão e sensibilidade dentária,

aftas, ardência bucal e gosto azedo que os controles. Em uma dissertação de mestrado realizada no Brasil com pacientes com transtornos alimentares subtipo purgativo, concluiu o mesmo que o artigo de Dynsen et al., 2008, no qual obteve como resultados que a autoindução do vômito não interferiu na integridade da mucosa e que a incidência de erosão está relacionada com o tempo do TA. A detecção precoce dessas doenças pode significar o sucesso clínico, pois se diagnosticada e tratada em estágios iniciais, podem reduzir os impactos na saúde geral e bucal causados por essas desordens. A saliva é uma ferramenta, que está sendo amplamente utilizada por ser um espelho da saúde bucal e sistêmica do indivíduo. A razão pela qual a saliva está sendo potencialmente utilizada é pelo fato dela conter substâncias existentes no plasma humano. Quando comparada com o sangue, a saliva contém uma pequena quantidade de proteínas, dessa forma diminuindo qualquer interferência e interações hidrostáticas que podem ocorrer na corrente sanguínea. Outro ponto favorável que a coleta salivar é simples e segura, tanto para quem está coletando, quanto para o paciente e é considerado um método não invasivo.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

O objetivo específico deste estudo será avaliar nos pacientes com DRGE e TAs: A. Características socioeconômicas; B. Xerostomia e fluxo salivar; C. Condição sistêmica dos pacientes através de um procedimento menos invasivo, que não gera estímulos dolorosos e ansiedades, comuns em exames de coleta de sangue; D. Composição salivar dos pacientes afetados com constante ataque ácido seja diferente e que haja marcadores específicos nos indivíduos afetados; E. Avaliar se a ingestão de medicamentos com potencial xerostômico pode interferir na síntese de Mucina. Objetivo Secundário: Montar um painel de proteínas dos pacientes e comparar estas proteínas com o controle intra indivíduo e inter indivíduos, com o intuito de identificar proteínas existentes ou não, sendo assim, encontrando um possível marcador oral para DRGE e TAs.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Os riscos serão mínimos, devido a coleta de saliva e ao responder os questionários. Cuspir no pote de coleta da saliva durante 15 minutos e depois por mais 5 minutos pode ser desconfortável. Benefícios: O participante do estudo será beneficiado pela profilaxia dental e ainda estará nos ajudando a contribuir com a pesquisa em saúde bucal relacionada aos pacientes que tem o diagnóstico de anorexia nervosa, bulimia nervosa e doença do refluxo gastroesofágico. A evolução da pesquisa nessa área pode melhorar a qualidade de vida dessas pessoas.

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar

Bairro: Cerqueira Cesar

CEP: 05.403-010

UF: SP

Município: SÃO PAULO

Telefone: (11)2661-7585

Fax: (11)2661-7585

E-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br

USP - HOSPITAL DAS
CLÍNICAS DA FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE

Continuação do Parecer: 1.928.531

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Haverá retenção de amostras para armazenamento em banco? Sim. Justificativa: As salivas coletadas serão armazenadas para futuras pesquisas na área proteômica.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados.

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não apresenta óbices éticos que impeçam sua aprovação.

Considerações Finais a critério do CEP:

: Em conformidade com a Resolução CNS nº 466/12 – cabe ao pesquisador: a) desenvolver o projeto conforme delineado; b) elaborar e apresentar relatórios parciais e final; c) apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; d) manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; e) encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; f) justificar perante ao CEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_841570 E1.pdf	11/12/2016 18:30:18		Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Carta_HC.pdf	11/12/2016 15:14:40	Camilla Vieira Esteves dos Santos	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Anexo_A_TCLE_16_05_2016.pdf	16/05/2016 14:55:05	Camilla Vieira Esteves dos Santos	Aceito
Orçamento	Orcamento.pdf	12/05/2016 23:11:18	Camilla Vieira Esteves dos Santos	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Completo_12_05_2016.pdf	12/05/2016 11:36:21	Camilla Vieira Esteves dos Santos	Aceito
Outros	Anexo_F_Questionario.pdf	11/05/2016 22:19:16	Camilla Vieira Esteves dos Santos	Aceito

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar

Bairro: Cerqueira Cesar

CEP: 05.403-010

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)2661-7585

Fax: (11)2661-7585

E-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br

USP - HOSPITAL DAS
CLÍNICAS DA FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE

Continuação do Parecer: 1.928.531

Outros	Carta_autorizacao_clinica.pdf	11/05/2016 20:35:23	Camilla Vieira Esteves dos Santos	Aceito
Folha de Rosto	PB_Brasil.pdf	11/05/2016 20:32:26	Camilla Vieira Esteves dos Santos	Aceito
Cronograma	Cronograma.pdf	10/05/2016 14:43:29	Camilla Vieira Esteves dos Santos	Aceito
Outros	Anexo_E_Questionario.pdf	10/05/2016 14:37:08	Camilla Vieira Esteves dos Santos	Aceito
Outros	Anexo_D_Questionario.pdf	10/05/2016 14:34:16	Camilla Vieira Esteves dos Santos	Aceito
Outros	Anexo_C_Questionario.pdf	10/05/2016 14:32:56	Camilla Vieira Esteves dos Santos	Aceito
Outros	Anexo_B_Questionario.pdf	10/05/2016 14:29:38	Camilla Vieira Esteves dos Santos	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 16 de Fevereiro de 2017

Assinado por:
ALFREDO JOSE MANSUR
(Coordenador)

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar

Bairro: Cerqueira Cesar

CEP: 05.403-010

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)2661-7585

Fax: (11)2661-7585

E-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br

ANEXO C – Parecer emitido pelo Comitê de ética em Pesquisa em Ciências da Saúde envolvendo seres humanos da University of Western Ontario

**Western
Research**

Research Ethics

**Western University Health Science Research Ethics Board
HSREB Annual Continuing Ethics Approval Notice**

Date: May 23, 2017

Principal Investigator: Dr. Walter Siqueira

Department & Institution: Schulich School of Medicine and Dentistry\Dentistry, Western University

Review Type: Delegated

HSREB File Number: 6251

Study Title: Composition, Structure and Function of Salivary Proteins

Sponsor: Natural Sciences and Engineering Research Council

HSREB Renewal Due Date & HSREB Expiry Date:

Renewal Due -2018/05/31

Expiry Date -2018/06/25

The Western University Health Science Research Ethics Board (HSREB) has reviewed the Continuing Ethics Review (CER) Form and is re-issuing approval for the above noted study.

The Western University HSREB operates in compliance with the Tri-Council Policy Statement Ethical Conduct for Research Involving Humans (TCPS2), the International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use Guideline for Good Clinical Practice (ICH E6 R1), the Ontario Freedom of Information and Protection of Privacy Act (FIPPA, 1990), the Ontario Personal Health Information Protection Act (PHIPA, 2004), Part 4 of the Natural Health Product Regulations, Health Canada Medical Device Regulations and Part C, Division 5, of the Food and Drug Regulations of Health Canada.

Members of the HSREB who are named as Investigators in research studies do not participate in discussions related to, nor vote on such studies when they are presented to the REB.

The HSREB is registered with the U.S. Department of Health & Human Services under the IRB registration number IRB 00000940.

Ethics Officer, on behalf of Dr. Joseph Gilbert, HSREB Chair

EO: Erika Basile ☐ Grace Kelly ☐ Katelyn Harris ☐ Nicola Morphet ☐ Karen Gopaul ☒ Patricia Sargeant