Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru

Senda Charone

Análise proteômica da matriz do esmalte nos estágios de secreção e maturação em camundongos susceptíveis ou resistentes à fluorose dentária, expostos cronicamente ao fluoreto através da água de beber.

SENDA CHARONE

**Análise proteômica da matriz do esmalte nos estágios de secreção e
maturação em camundongos susceptíveis ou resistentes à fluorose dentária,
expostos cronicamente ao fluoreto através da água de beber**

Tese apresentada a Faculdade de Odontologia de Bauru da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências no Programa de Ciências
Odontológicas Aplicadas, na área de concentração
Biologia Oral.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Marília Afonso Rabelo Buzalaf

Versão Corrigida

BAURU
2013

C383a Charone, Senda
Análise proteômica da matriz do esmalte nos estágios de secreção e maturação em camundongos susceptíveis ou resistentes à fluorose dentária, expostos cronicamente ao fluoreto através da água de beber/Senda Charone. – Bauru, 2013.
241 p. : il. ; 30cm.

Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Marília Afonso Rabelo Buzalaf

Nota: A versão original desta tese encontra-se disponível no Serviço de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Odontologia de Bauru – FOB/USP.

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, por processos fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura:

Data:

Comitê de Ética da FOB-USP
Protocolo nº: 008/2011
Data: 12 de abril de 2011

DADOS CURRICULARES

Filiação	Nagib Charone Filho Maria da Graça Pereira Charone
15/09/1979	Nascimento – Belém-PA
1998-2003	Graduação em Odontologia pelo Centro Universitário do Estado do Pará (CESUPA)
2003-2003	Curso de Aperfeiçoamento em Odontopediatria pela Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro (FO-UFRJ)
2004-2004	Curso de Especialização em Odontopediatria pela Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro (FO-UFRJ)
2005-2005	Curso de Especialização em Saúde Coletiva pela Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro (FO-UFRJ)
2007-2009	Curso de Pós-graduação em Odontopediatria, nível Mestrado, pela Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro (FO-UFRJ)
2009-2013	Curso de Pós-graduação em Biologia Oral, nível Doutorado, pela Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo (FOB-USP)
2009-2013	Bolsista de Doutorado FAPESP (processo nº 2009/10589-6) sob orientação da Profa. Dra. Marília Afonso Rabelo Buzalaf (FOB-USP)
2011-2012	Curso de Aperfeiçoamento em Clínica Integrada Restauradora pela Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo (FOB-USP)
Associações	CRO/RJ - Conselho Regional de Odontologia do Estado de Rio de Janeiro SBPqO - Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica IADR – International Association for Dental Research ORCA – European Organization for Caries Research

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente a **Deus**, pois, somente ele nos deu ricas promessas que nos ajudam a crescer na nossa vida pessoal e diária, bem como no serviço fiel a Cristo. Ao mesmo tempo em que ele nos chamou ao perdão e à vida eterna, ele também nos abriu as portas para dimensões de plenitude cada vez maiores.

Dedico este trabalho aos meus pais **Nagib Charone Filho** e **Maria da Graça Pereira**, aos meus irmãos **Semel** e **Sader Charone** e, à minha avó **Therezinha** pelo incentivo, compreensão, companheirismo e amor incondicional durante minha árdua e vitoriosa caminhada. Herdar a pertinácia, o arrojo, o destemor e, sobretudo, a paixão, são atributos marcantes não apenas da minha trajetória de vida, mas, de minha saga para a realização deste grande projeto. O que aprendi, incentivada pela minha família, foi vital para a realização desta conquista. A disciplina, a dedicação, a persistência, a obstinação, são atributos que carrego comigo há 10 anos desde minha partida. Estava escrito havia 10 anos que eu certamente estaria diante deste momento. Para onde quer que eu olhasse, sempre enxergava um exemplo de integridade e firmeza moral entre os meus. Esta foi a minha educação, da qual me orgulho. De minha parte, o carinho, o afeto e a admiração se unem a um forte aplauso!! Amo vocês!!

Aos meus sobrinhos, **Suri** e **Amauryzinho**, dádivas que nos permitem retornar a infância e partilhar de momentos únicos e intensos. Obrigada por receber a oportunidade de amar sem limites um novo “ser” e se permitir todas as loucuras e excessos sem culpa, por ter a certeza que só por hoje nada fará mal. A titia Senda ama vocês !!!

Ao meu estimado cunhado **Amaury** e cunhada **Fabiane**, tia **Maxi**, e amigas de longas datas **Tatyane Santana** e **Luciana Pará**, pelos votos de confiança e admiração durante minha longa jornada! Minha grande estima !

Ao meu animalzinho de estimação **Toddy** !! Um presente de Deus !!

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À Profa Dra Marília Afonso Rabelo Buzalaf

À minha Orientadora Dra. Marília Afonso Rabelo Buzalaf que tanto contribuiu para minha formação, dando exemplo de honestidade, justiça e amor. Parece que foi ontem, não é mesmo minha professora. Lembro do dia em que você me enviou o e-mail questionando sobre qual projeto que eu gostaria de participar. Desde tal seleção, a minha história estava com dias contados e as mudanças eram previsíveis e inevitáveis. Atrás de um título, viria um “mar” de conhecimento e amadurecimento. Não foi fácil não é mesmo minha professora, desde a importação dos animais, o dia-a-dia dos tratamentos no biotério e longas horas de laboratório, a convivência agradável e mais do que isso, a consolidação das amizades neste grande grupo de pesquisa. Encarar uma linha de pesquisa como o Proteoma, foi o grande presente que você me deu. Confesso que no início existiu algumas resistências, mas, foram sendo totalmente esmagadas e esquecidas ao longo do continuo amadurecimento frente ao assunto. O medo do novo, ainda era um entrave ao meu crescimento, no entanto, com a sua sabedoria e paciência, este sentimento foi sendo paulatinamente substituído pelo meu entusiasmo frente ao tema. Foi neste momento que o meu discurso começou a mudar e eu também mudei, vários questionamentos começaram a surgir, que tese é essa não é professora. Essa tese era sim pra ser minha sim, já estava escrito, e eu estou apaixonada pela minha tese, se tivesse que fazer tudo outra vez eu faria com o mesmo esmero. Não sou mais a mesma não é minha professora e você contribuiu substancialmente para o meu amadurecimento com muita propriedade. Juntas desbravamos “o mundo das proteínas do esmalte” não é mesmo “minha borda rugosa”. Foram 4 anos, juntas, lutamos, discordamos, erramos, recomeçamos, vibramos, comemoramos sempre sacrificando seus sonhos em prol dos meus. Verso aqui, um texto de *Érico Veríssimo*, dedicado a você onde ele descreve que “A dor alimenta a coragem e, a felicidade não é um prêmio, e sim uma consequência. A felicidade não está no fim da jornada, e sim em cada curva do caminho que percorremos para encontrá-la. A gente tropeça sempre nas pedras pequenas, porque as grandes a gente logo enxerga. A glória da amizade não é a mão estendida, nem o sorriso carinhoso, nem mesmo a delícia da companhia. É a inspiração espiritual que vem quando você descobre que alguém acredita e confia em você. A inteligência é o farol que nos guia, mas é a vontade que nos faz caminhar.

A maior fraqueza de uma pessoa é trocar aquilo que ela mais deseja na vida, por aquilo que ela deseja no momento. A persistência é o caminho do êxito. A verdadeira amizade deixa marcas positivas que o tempo jamais poderá apagar. Amigos são como flores cada um tem o seu encanto por isso cultive-os. Celebrar a vida é somar amigos, experiências e conquistas, dando-lhes sempre algum significado. Felicidade é a certeza de que a nossa vida não está se passando inutilmente”

Obrigada por superar ao meu lado, minhas decepções e aplaudir minhas conquistas. Noites mal dormidas serão hoje esquecidas por mim, pois vejo que tudo valeu à pena !!

À Profa Dra Sonia Groisman

Naquele momento em que voce me estendeu a mão começou a ser escrita a história de minha grande conquista!! Esta vitória não faria sentido sem a sua presença. A sua exigência fez eu chegar aonde eu estou. E nao foi fácil nao e mesmo professora. Limitações, teimosias, cansaço, realização. O melhor de uma vitória não é vencer propriamente, mas, descobrir que existem pessoa que sempre acreditaram em voce. Expresso minha eternal gratidão !!!

À Aline de Lima Leite

(Lô) Meus eternos agradecimentos por todo ensinamente para o desenvolvimento deste trabalho. Voce é um exemplo de profissionalismo e dedicação incansável para nós alunas que reconhecem o grande trabalho que você desenvolve. Obrigada pela sua amizade e companheirismo por dias e noites no laboratório. Obrigada por caminhar ao meu lado durante todo o desenvolvimento deste trabalho. E tenho certeza que se tudo deu certo, a sua dedicação contribuiu para este desfecho.

À Camila Buzalaf, Mileni Fernandes e Lucas Ferreira de Almeida

O melhor presente das longas jornadas é saber que não estamos só. O reconhecimento e amadurecimento das verdadeiras amizades se faz necessário frente aos desafios do cotidiano. Posso dizer que sou uma pessoa de muita sorte de ter vocês como companheiros de longas horas de laboratório. Esse trabalho não é somente meu, ele é nosso !!!

AGRADECIMENTOS

Às minhas amigas de Doutorado que também ajudaram no meu amadurecimento científico, **Kellen Gasque, Cíntia Maria de Souza-e-Silva, Alessandra Cury**, muito obrigada pela indispensável participação. Sem o trabalho em equipe nada é possível! Em especial obrigada a minha amiga **Cristiane Baldini** que soube me ouvir quando mais precisei, nos momentos mais turbulentos reagiu com sabedoria às minhas angústias, trazendo consigo sempre uma palavra de conforto.

Aos demais amigos de longas horas de laboratório, **Lívia Comar, Luiza de Paula, Flávia Levy, Thiemi Kato, Aline Dionizio, Aline Castilho, Bruno Zarella, Flávia Iano, Priscila Salomão, Flávia Amadeu, Adriana, Heloisa Pereira, Taisa Delecrode, Isabela Tomazini, Fernanda Zucki, Maria Cecília, Janete, Mel Rodrigues, Vinicius Taioqui, Priscila Barreta, Beatriz Souza e Juliane Carvalho**. O meu muito obrigada pela amizade.

Ao meu grande amigo **Juliano Pessan**, um exemplo de perseverança e inteligência naquilo que faz. Você além de um grande amigo, você é um exemplo de determinação. Obrigada pela amizade e apoio nos momentos que mais precisei de ajuda. Te adoro meu amigo !!

Aos funcionários do laboratório de Bioquímica, **Larissa, Thelma, e Ovídio**. Muito obrigada pelo apoio para a realização deste trabalho. Em especial muito obrigada à **Larissa Grizzo** pelas análises de fluoreto das amostras de plasma e esmaltes, e ainda pelo presente de uma grande amizade.

Agradeço aos professores do departamento de Ciências Biológicas, disciplina de **Bioquímica** da **FOB-USP**, **Prof. Dr. Rodrigo Cardoso** e **Prof^a Dr^a Ana Carolina Magalhães**, pelos conhecimentos e experiências transmitidos, pelo auxílio e críticas construtivas durante o curso de Doutorado. Obrigada à **Prof^a Dr^a Ana Carolina Magalhães** pelo grande exemplo de profissionalismo, dedicação e carinho. Além de agradecer pelos constantes ensinamentos ao longo destes 4 anos de convivência, um dos grandes presentes que ganhei foi a sua amizade. Te adoro Carol !

Aos funcionários do **Biotério Central**, da **FOB-USP** pelo auxílio prestado ao longo do período de tratamento dos animais.

Ao **Prof. Dr. Carlos Alberto Labate, Monica Labate e Thais Regiani**, da **ESALQ-USP**, pelo carinho e recebimento em seu laboratório, sempre dispostas a nos ajudar.

À **Romenia Ramos Domingues, Bianca Alves Pauletti**, e em especial **Adriana Franco Paes Leme** do **Laboratório de Espectrometria de Massas (LNBio)**, pelo recebimento durante as análises de minha pesquisa. Além do convívio agradável durante as análises, o meu eterno agradecimento pela oportunidade de conhecer um dos Centros de Pesquisa de Energia mais importantes da América Latina.

Aos **Profs. José Mondelli e Rafael Mondelli** e seus funcionários do **Departamento de Dentística FOB-USP**, pelo convívio agradável durante meu Curso de Atualização em Clínica Integrada. É um grande prazer ter tido a oportunidade de conhecer tão renomados Profs. da nossa Odontologia. Expresso minha grande admiração pela simplicidade e paciência com seus alunos.

À **Meg, Ana Paula, Letícia, Fátima e Leila**, (**FOB-USP**) pelo auxílio e orientação na secretaria de pós-graduação. Às funcionárias **Dalva e Vera** (**FOB-USP**) por serem sempre solícitas e dispostas a ajudar.

Às Profas. **Suely Mendes Ribeiro e Dóris Kós Miranda** (**Belém PA**) recebam minha gratidão e reconhecimento de que nos méritos desta longa caminhada há um pouco da presença de vocês.

Aos queridos Professores, funcionários, alunos e amigos de Mestrado da **UFRJ**. Meu eterno agradecimento pelos ensinamentos e agradável convívio durante 6 anos de minha estadia na cidade do Rio de Janeiro. Participar de tão renomada Instituição foi um grande presente. Meu eterno agradecimento por esta etapa também vencida !!!

Às minhas vizinhas e amigas **Grazi, Natalia, Flavia, Clóris e Patrícia** pelo agradável convívio dia-a-dia ao longo de minha jornada. Meus sinceros agradecimentos !!!

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

À **FAPESP**, pelo indispensável auxílio financeiro fornecido, proporcionando não apenas a realização deste trabalho através do processo nº 2009/10589-6, como também a participação em congressos nacionais e internacionais, e apoio em diferentes centros de pesquisas de grande relevância para o meu aprimoramento científico e pessoal.

À Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo, na pessoa de seu Diretor **Prof. Dr. José Carlos Pereira** e Vice-Diretora **Prof^a Dr^a Maria Aparecida Moreira Machado**. Obrigada pela oportunidade de cursar o Doutorado nesta instituição modelo no nosso país.

“Não nos perguntamos qual o propósito dos pássaros cantarem, pois o canto é o seu prazer, uma vez que foram criados para cantar. Similarmente, não devemos perguntar porque a mente humana se inquieta com a extensão dos segredos dos céus...
A diversidade do fenômeno da Natureza é tão vasta e os tesouros escondidos nos céus tão ricos, precisamente para que a mente humana nunca tenha falta de alimento”

Johannes Kepler

RESUMO

Análise proteômica da matriz do esmalte nos estágios de secreção e maturação em camundongos susceptíveis ou resistentes à fluorose dentária, expostos cronicamente ao fluoreto através da água de beber

Os mecanismos pelos quais a ingestão excessiva de fluoreto (F) durante a amelogênese levam à fluorose dentária ainda não são precisamente conhecidos. Tem sido demonstrado que determinadas linhagens de camundongos são mais susceptíveis que outras à fluorose dentária, o que faz destas linhagens o modelo ideal para se estudarem os fenômenos moleculares envolvidos nesta patologia. No presente estudo, foi empregada uma abordagem proteômica para avaliar alterações na expressão de proteínas da matriz do esmalte dentário nos estágios de secreção e maturação, em duas linhagens de camundongos com diferentes susceptibilidades à fluorose (A/J, susceptível e 129P3/J, resistente). Camundongos de ambos os gêneros, representantes das linhagens 129P3/J (n=200) e A/J (n=200) foram distribuídos em dois grupos para cada linhagem, que receberam ração com baixa concentração de F e água de beber contendo 0 (controle) ou 50 mg/L F por 6 semanas. A concentração de F foi analisada no plasma e no esmalte dos incisivos. Para a análise proteômica, foi realizada a raspagem da matriz do esmalte dos incisivos, nos estágios de secreção e maturação. Para a extração das proteínas do esmalte, foram pesados 15 mg de pó da matriz do esmalte, aos quais foi adicionado 1 mL de tampão de lise contendo uréia 7 M, tiouréia 2 M, CHAPS 4 %, DTT 1 %, anfólitos carregadores 0,5 % pH 3-10 e um coquetel de inibidores de proteases. As proteínas do esmalte extraídas para cada grupo foram separadas pela técnica de eletroforese bidimensional e posteriormente submetidas a LC-ESI-MS/MS. A concentração média ($\pm$ DP) de F encontrada no plasma dos camundongos foi de $0,023 \pm 0,010$ e $0,019 \pm 0,007$ mg/L para os animais do grupo controle, das linhagens A/J e 129P3/J, respectivamente, e de $0,151 \pm 0,043$ e de $0,252 \pm 0,060$ mg/L de F para os animais das linhagens A/J e 129P3/J, respectivamente, tratados com água contendo 50 mg/L de F. A ANOVA a 2 critérios revelou que houve diferença significativa entre os tratamentos ($F=658,0$, $p<0,0001$), mas não entre as linhagens ($F=3,3$ $p=0,075$), tendo havido interação significativa entre estes critérios ($F=16,50$, $p=0,0002$). Já a concentração média ($\pm$ DP) de F incorporado no esmalte dos incisivos dos camundongos foi $471,4 \pm 215,8$ mg/kg e $151,7 \pm 58,8$ mg/kg para os animais do grupo controle das linhagens 129P3/J e A/J, respectivamente, e $2711,2 \pm 1019,2$ mg/kg, $1756,9 \pm 921,6$ mg/kg

para os animais das linhagens 129P3/J e A/J, respectivamente, tratados com água contendo 50 mg/L de F. A ANOVA a 2 critérios encontrou diferença significativa entre as linhagens ($F=11,36$, $p=0,0016$) e entre os tratamentos ($F=103,50$, $p<0,0001$), sem interação significativa entre ambos ($F=2,82$, $p=0,1004$). Os resultados proteômicos mostraram redução na abundância de proteínas no estágio de maturação, quando comparado com o de secreção. Foi observado que o tratamento com F aumentou consideravelmente o número de *spots* proteicos detectados em ambos os estágios, sendo que este aumento foi maior para os animais da linhagem A/J, indicando uma tentativa de se combater os efeitos deletérios do F e reforçando a maior susceptibilidade aos seus efeitos desta linhagem. A identificação das proteínas com expressão diferencial revelou que tanto a linhagem quanto o tratamento com F levaram à expressão diferencial de proteínas pertencentes a todas as categorias funcionais.

ABSTRACT

Proteomic analysis of secretory and maturation-stage enamel matrix in mice susceptible or resistant to dental fluorosis, chronically exposed to fluoride in the drinking water

The mechanisms by which excessive ingestion of fluoride (F) during amelogenesis leads to fluorosis are still not precisely known. It has been shown that certain strains of mice are more susceptible to dental fluorosis than others, which turns these strains the ideal model for studying the molecular phenomena involved in this pathology. In the present study, we employed a proteomic approach to identify and evaluate changes in protein expression of secretory and maturation-stage enamel matrix in two strains of mice with different susceptibilities to dental fluorosis (A/J, susceptible and 129P3/J, resistant). Mice of both genders, from 129P3/J (n=200) and A/J (n=200) strains were divided into two groups for each strain. They received a low-F diet and drinking water containing 0 (control) or 50 mg/L F for 6 weeks. The F concentration was analyzed in plasma and enamel incisors. For proteomic analysis, the enamel matrix of secretory and maturation stages (incisors) was scrapped. For the extraction of enamel proteins, 1 ml of lysis buffer containing 7 M urea, 2 M thiourea, 4% CHAPS, 1% DTT, 0.5% ampholytes carriers pH 3-10 and a cocktail of protease inhibitors was added to 15 mg of enamel matrix powder. The enamel proteins extracted for each group were separated by two-dimensional electrophoresis and subsequently subjected to LC-ESI-MS/MS. The mean ($\pm$ SD) F concentrations found in plasma were 0.023 ± 0.010 and 0.019 ± 0.007 mg/L for the control group, A/J and 129P3/J strains, respectively; and 0.151 ± 0.043 and 0.252 ± 0.060 mg/L F for A/J and 129P3/J mice, respectively, treated with water containing 50 mg/L F. Two-way ANOVA revealed significant differences between treatments ($F = 658.0$, $p < 0.0001$), but not between strains ($F = 3.3$ $p = 0.075$), with was significant interaction between these criteria ($F = 16.50$, $p = 0.0002$). The mean ($\pm$ SD) F concentrations in the enamel of the incisors were 471.4 ± 215.8 mg/kg and 151.7 ± 58.8 mg/kg for the control group of 129P3/J and A/J strains, respectively; and 2711.2 ± 1019.2 mg/kg and 1756.9 ± 921.6 mg/kg for 129P3/J and A/J mice, respectively, treated with water containing 50 mg/L F. Two-way ANOVA detected significant differences between the strains ($F=11.36$, $p=0.0016$) and between treatments ($F=103.50$, $p < 0.0001$), without significant interaction between these criteria ($F=2.82$, $p=0.1004$). The proteomic results revealed a reduction in the abundance of proteins in the maturation stage, as compared with the secretory stage.

Treatment with F greatly increased the number of protein spots detected in both stages. This increase was greater for A/J mice, indicating an attempt to fight the deleterious effects of F and, thus, reinforcing the susceptibility of this strain to the effects of F. The identification of differentially expressed proteins revealed that both the strain and the treatment with F led to differential expression of proteins belonging to all functional categories.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Etapas envolvidas no processo de separação de proteínas por eletroforese bidimensional. Inicialmente, as proteínas solubilizadas de uma amostra são separadas de acordo com o seu pI (primeira dimensão). Após a focalização, as mesmas são transferidas para um gel de poliacrilamida, onde são separadas de acordo com sua massa molecular relativa (segunda dimensão) (LEITE, 2010).....	81
Figura 2.	Gaiolas metabólicas que foram utilizadas para o controle do consumo de ração e água administradas aos camundongos. Durante o período experimental, os animais permaneceram em pares e separados por gênero.....	92
Figura 3.	Mandíbulas/Incisivos extraída(o)s dos camundongos das linhagens A/J (esquerda) e 129P3/J (direita).....	94
Figura 4.	As placas de Petri foram vaselinadas e em seguida as amostras foram adicionadas (a). Adição de 2 mL de água deionizada e 50 µL de NaOH 0,05 M na tampa da placa de Petri (b). Fechamento das placas e adição de 2 mL de HMDS (c). Leitura das amostras com um Eletrodo Orion 9409 e um micro eletrodo calomelano de referência para leitura de F (d).....	96
Figura 5.	Preparo inicial dos incisivos. Inicialmente os dentes foram dissecados da mandíbula e lavados com água deionizada. Em seguida, a polpa foi removida e os mesmos foram novamente lavados e deixados em estufa para completa desidratação.....	97
Figura 6.	Preparo dos dentes para biopsia. Inicialmente a fita foi colocada sob a superfície do dente e em seguida o restante da superfície foi isolado com esmalte de unha. Após a secagem do esmalte, a fita foi removida e a área ficou pronta para realização da biópsia.	98
Figura 7.	Focalização Isoelétrica no Ettan IPGphor 3 (GE Healthcare).....	103
Figura 8.	Segunda dimensão em géis SDS-PAGE de 5-20% de acrilamida (200 mm X 250 mm X 1mm) no sistema SE 600 Ruby (Ge Healthcare).....	104
Figura 9.	Excisão e recorte dos <i>spots</i> selecionados para espectrometria de massa. Os <i>spots</i> provenientes dos 3 géis obtidos para cada grupo são inicialmente captados com uma ponteira plástica. Depois, são cortados em fragmentos de cerca 1 mm ³ com lâmina de bisturi.....	105

Figura 10.	Seleção dos parâmetros de busca de íons MS/MS na base MASCOT.....	108
Figura 11.	Média do peso corporal (g) inicial e final após 6 semanas de tratamento) para os camundongos das linhagens 129P3/J e A/J em função da [F] na água de beber. Para cada peso, letras maiúsculas e minúsculas indicam diferença significativa entre as linhagens e tratamentos, respectivamente. Barras indicam desvio-padrão. n=36 para os grupos controle e 42 para os grupos tratados (ANOVA a 2 critérios e teste de Bonferroni, $p<0,05$).....	113
Figura 12.	Média da quantidade de água ingerida (g) em 24 h pelos animais da linhagem 129P3/J e A/J em cada uma das 6 semanas de tratamento. Os valores se referem a dados de 2 animais alojados na mesma gaiola metabólica.	114
Figura 13.	Concentração média de F presente no plasma (mg/L) de F, dos camundongos das linhagens A/J e 129P3/J submetidos a tratamento com água contendo ou não 50 mg/L de F. Letras maiúsculas e minúsculas indicam diferença significativa entre as linhagens e tratamentos, respectivamente (ANOVA a 2 critérios após transformação logarítmica e teste de Bonferroni, $p<0,05$. Barras indicam desvio-padrão. n=15, sendo cada resultado correspondente ao “pool” do plasma de 5 animais).....	117
Figura 14.	Concentração média de F (mgF/kg) em incisivos superiores dos animais das linhagens A/J e 129P3/J que ingeriram ou não F (50 mg/L de F) através da água de beber. Letras maiúsculas e minúsculas indicam diferença significativa entre as linhagens e tratamentos, respectivamente. Barras indicam desvio-padrão. n=15 (ANOVA a 2 critérios e teste de Bonferroni, $p<0,05$).....	119
Figura 15.	Géis bidimensionais representativos de cada linhagem (129P3/J e A/J) para os estágios de secreção e maturação do esmalte, expostos ou não ao F.....	124
Figura 16.	Número total de <i>spots</i> protéicos detectados por grupo, com base na análise das triplicatas realizada por meio do programa <i>Image Master 2D Platinum 7.0</i> (GE Healthcare).	125
Figura 17.	Gel bidimensional representativo para amostras provenientes da matriz do esmalte do estágio de secreção de animais da linhagem A/J do grupo controle (A) e linhagem 129P3/J do grupo controle (B) . As proteínas foram focalizadas em <i>strips</i> de 13 cm e faixa de pH 3-10 linear, e em seguida separadas pela massa molecular em gel de poliacrilamida 5-20% e coradas com azul de <i>Coomassie</i> coloidal G250.....	126

Figura 18.	Gel bidimensional representativo para amostras provenientes da matriz do esmalte do estágio de secreção , de animais da linhagem A/J do grupo tratado (A) e 129P3/J do grupo tratado (B) . As proteínas foram focalizadas em <i>strips</i> de 13 cm e faixa de pH 3-10 linear, e em seguida separadas pela massa molecular em gel de poliacrilamida em gradiente 5-20% e coradas com azul de <i>Coomassie</i> coloidal G250.	127
Figura 19.	Gel bidimensional representativo para amostras provenientes da matriz do esmalte do estágio de maturação , de animais da linhagem A/J do grupo controle (A) e 129P3/J do grupo controle (B) . As proteínas foram focalizadas em <i>strips</i> de 13 cm e faixa de pH 3-10 linear, e em seguida separadas pela massa molecular em gel de poliacrilamida em gradiente 5-20% e coradas com azul de <i>Coomassie</i> coloidal G250.	128
Figura 20.	Gel bidimensional representativo para amostras provenientes da matriz do esmalte do estágio de maturação , de animais da linhagem A/J do grupo tratado (A) e 129P3/J do grupo tratado (B) . As proteínas foram focalizadas em <i>strips</i> de 13 cm e faixa de pH 3-10 linear, e em seguida separadas pela massa molecular em gel de poliacrilamida em gradiente 5-20% e coradas com azul de <i>Coomassie</i> coloidal G250.	129
Figura 21.	A figura acima destaca alguns <i>spots</i> com diferença de expressão revelada pela ANOVA ($p < 0,05$). À direita, seta em azul, o <i>spot</i> 72 encontra-se 1,3 vezes superexpresso em relação ao grupo 129P3/JC_MS, seta vermelha.	132
Figura 22.	A figura acima destaca alguns <i>spots</i> com diferença de expressão revelada pela ANOVA ($p < 0,05$). À direita, seta em azul, o <i>spot</i> 72 encontra-se 1,7 vezes superexpresso em relação ao grupo 129P3/JT_MS, seta vermelha.	133
Figura 23.	A figura acima destaca alguns <i>spots</i> ausentes no grupo 129P3/JT_MM, a esquerda, quando comparado ao grupo A/JT_MM, a direita . A seta azul indica o <i>spot</i> 72.	134
Figura 24.	A figura acima destaca alguns <i>spots</i> com diferença de expressão revelada pela ANOVA ($p < 0,05$). À direita, seta em azul, o <i>spot</i> 72 encontra-se 1,1 vez superexpresso em relação ao grupo A/JC_MS, seta vermelha.	135
Figura 25.	A figura acima destaca alguns <i>spots</i> ausentes no grupo A/JC_MM, a esquerda, quando comparado ao grupo A/JT_MM, a direita. A seta azul indica o <i>spot</i> 72.	136
Figura 26.	A figura acima destaca alguns <i>spots</i> com diferença de expressão revelada pela ANOVA ($p < 0,05$). À direita, seta em azul, o <i>spot</i> 72 encontra-se 1,2 vezes superexpresso em relação ao grupo 129P3/JC_MS, seta vermelha.	137

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Concentração de F (mg/L) na água de beber fornecida semanalmente para os camundongos da linhagem A/J durante as 6 semanas de tratamento.....	115
Tabela 2.	Proteínas identificadas com diferença de expressão ($p < 0,05$) entre os grupos A/JC_MS e 129P3/JC_MS	138
Tabela 3.	Proteínas pertencentes exclusivamente ao grupo A/JC_MS quando comparado ao grupo 129P3/JC_MS	139
Tabela 4.	Proteínas pertencentes exclusivamente ao grupo 129P3/JC_MS quando comparado ao grupo A/JC_MS.	140
Tabela 5.	Proteínas identificadas com diferença de expressão ($P < 0,05$) entre os grupos A/JT_MS e 129P3/JT_MS	143
Tabela 6.	Proteínas pertencentes exclusivamente ao grupo A/JT_MS quando comparado ao grupo 129P3/JT_MS.....	144
Tabela 7.	Proteínas pertencentes exclusivamente ao grupo 129P3/JT_MS quando comparado ao grupo A/JT_MS.	145
Tabela 8.	Proteínas pertencentes exclusivamente ao grupo A/JC_MM quando comparado ao grupo 129P3/JC_MM.....	147
Tabela 9.	Proteínas pertencentes exclusivamente ao grupo 129P3/JC_MM quando comparado ao grupo A/JC_MM.	148
Tabela 10.	Proteínas identificadas com diferença de expressão ($p < 0,05$) entre os grupos A/JT_MM e 129P3/JT_MM.....	149
Tabela 11.	Proteínas pertencentes exclusivamente ao grupo A/JT_MM quando comparado ao grupo 129P3/JT_MM.	150
Tabela 12.	Proteínas pertencentes exclusivamente ao grupo 129P3/JT_MM quando comparado ao grupo A/JT_MM.....	154
Tabela 13.	Proteínas identificadas com diferença de expressão entre os grupos AJC_MS e A/JT_MS.	155
Tabela 14.	Proteínas pertencentes exclusivamente ao grupo A/JC_MS quando comparado ao grupo A/JT_MS.....	157
Tabela 15.	Proteínas pertencentes exclusivamente ao grupo A/JT_MS quando comparado ao grupo A/JC_MS	158
Tabela 16.	Proteínas com diferença de expressão entre os grupos A/JC_MM quando comparado ao grupo A/JT_MM.....	161
Tabela 17.	Proteínas pertencentes exclusivamente ao grupo A/JC_MM quando comparado ao grupo A/JT_MM	162
Tabela 18.	Proteínas pertencentes exclusivamente ao grupo A/JT_MM quando comparado ao grupo A/JC_MM	163

Tabela 19.	Proteínas identificadas com diferença de expressão ($p < 0,05$) entre os grupos 129P3/JC_MS e 129P3/JT_MS.....	168
Tabela 20.	Proteínas pertencentes exclusivamente ao grupo 129P3/JC_MS quando comparado ao grupo 129P3/JT_MS	168
Tabela 21.	Proteínas pertencentes exclusivamente ao grupo 129P3/JT_MS quando comparado ao grupo 129P3/JC_MS	169
Tabela 22.	Proteínas identificadas com diferença de expressão entre os grupos 129P3/JC_MM e 129P3/JT_MM.	171
Tabela 23.	Proteínas pertencentes exclusivamente ao grupo 129P3/JC_MM quando comparado ao grupo 129P3/JT_MM.....	171
Tabela 24.	Proteínas pertencentes exclusivamente ao grupo 129P3/JT_MM quando comparado ao grupo 129P3/JC_MM.....	172

LISTA DE SÍMBOLOS

[]	concentração
°C	grau Celsius
%	porcentagem
>	maior
<	menor
±	mais ou menos
~	equivalente
n ^o	número
µg	micrograma
µL	microlitro
g	grama
h	hora
kg	quilograma
mg	miligrama
mL	mililitro
M	molar
mm ²	milímetro quadrado
mV	milivoltagem
s	segundo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
2	REVISÃO DE LITERATURA	27
2.1	AMELOGÊNESE	29
2.1.1	Estágios da amelogênese	29
2.1.2	Matriz orgânica do esmalte.....	33
2.2	EFEITOS DO F NA AMELOGÊNESE.....	55
2.2.1	Efeitos do F nos diferentes estágios da amelogênese.....	56
2.2.2	Efeitos diretos do F nos ameloblastos	57
2.2.3	Efeitos do F na matriz do esmalte em formação	64
2.2.4	Efeitos do F na iniciação e crescimento dos cristais	72
2.2.5	Efeitos do F no pH da matriz do esmalte.....	74
2.3	SUSCEPTIBILIDADE GENÉTICA À FLUOROSE DENTÁRIA	76
2.4	ANÁLISE PROTEÔMICA	79
2.4.1	Eletroforese Bidimensional (2DE).....	81
2.4.2	Espectrometria de Massas (Mass Spectrometry - MS)	83
3	PROPOSIÇÃO	85
4	MATERIAL E MÉTODOS	89
4.1	OBTENÇÃO DOS ANIMAIS E TRATAMENTO COM F	91
4.2	EUTANÁSIA DOS ANIMAIS E COLETA DAS AMOSTRAS.....	93
4.3	DOSAGEM DE F NO PLASMA	94
4.4	DOSAGEM DE F INCORPORADO NO ESMALTE DOS INCISIVOS.....	96
4.4.1	Determinação do fósforo liberado pelo esmalte	99
4.5	DOSAGEM DE F NA ÁGUA DE BEBER	100

4.6	ANÁLISE PROTEÔMICA	101
4.6.1	Extração das proteínas da matriz do esmalte dos camundongos	101
4.6.2	Primeira Dimensão - Focalização Isoelétrica	102
4.6.3	Segunda Dimensão – SDS-PAGE.....	103
4.6.4	Visualização e análise de imagens da eletroforese bidimensional.....	104
4.6.5	Preparo das amostras para espectrometria de massas	105
4.6.6	Espectrometria de massas (LC-ESI-MS/MS).....	106
4.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	108
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	109
5.1	TRATAMENTO DOS ANIMAIS E DOSAGEM DE F.....	111
5.1.1	Peso corporal dos animais	112
5.1.2	Ingestão de água pelos animais.....	114
5.1.3	Concentração de F no plasma	115
5.1.4	Análise de F incorporado no esmalte	117
5.2	ANÁLISE PROTEÔMICA	120
5.2.1	Análise das imagens	123
5.2.2	Análise comparativa entre os grupos.....	130
5.2.3	Identificação das proteínas da matriz do esmalte.....	174
6	CONCLUSÕES	191
	REFERÊNCIAS	195
	APÊNDICES	233
	ANEXOS.....	239

Introdução

1 INTRODUÇÃO

A amelogênese é o processo de formação do esmalte dentário (LACRUZ et al., 2010b; SIMMER et al., 2012). Trata-se de um complexo processo no qual as proteínas da matriz do esmalte interagem para conduzir o crescimento dos cristais de hidroxiapatita (LACRUZ et al., 2010b; MORADIAN-OLDAK, 2012; SIMMER et al., 2012). As células responsáveis pela formação do esmalte, os ameloblastos, secretam proteínas da matriz e são responsáveis pela criação de um ambiente extracelular favorável à deposição de mineral (BARTLETT et al., 2006a; BARTLETT; NANJI, 2008; SIMMER, 1999; SMITH, 1998). Essas células, de origem epitelial, exibem um ciclo de vida caracterizado por mudanças progressivas que refletem suas atividades em vários estágios de desenvolvimento do esmalte (NANJI, 2008; PAINE et al., 2001). A amelogênese tem sido descrita em três estágios funcionais principais denominados estágio pré-secretor, secretor e de maturação. Primeiro, durante o estágio pré-secretor, os ameloblastos em diferenciação adquirem o seu fenótipo, mudam a polaridade, desenvolvem um extenso aparato sintetizador de proteína e se preparam para secretar a matriz orgânica do esmalte. Em seguida, durante o estágio secretor, os ameloblastos elaboram e organizam a espessura do esmalte, resultando na formação de um tecido altamente organizado. Por último, durante o estágio de maturação, os ameloblastos sofrem modulações cíclicas e transportam íons específicos necessários para o concomitante acréscimo de minerais (NANJI, 2008).

Ao longo dos anos, as atividades que ocorrem durante cada estágio de formação do esmalte foram sendo extensamente definidas. Estudos ultraestruturais avaliando a formação do esmalte têm ajudado na compreensão desse complexo processo. Esses estudos frequentemente utilizam como modelo incisivos de ratos, que apresentam rápida e contínua erupção dentária, pelo fato de todos os estágios de desenvolvimento poderem ser visualizados em um único dente e, por apresentarem grande semelhança com os estágios de formação do esmalte de dentes humanos (BRONCKERS; LYARUU; DENBESTEN, 2009; NANJI, 2008).

Sabe-se que a composição da matriz orgânica do esmalte é basicamente proteica, contendo carboidratos e lipídios. É importante ressaltar que as proteínas dessa matriz são de natureza não colagênica, característica que a distingue da matriz dos outros tecidos mineralizados, denotando a origem não conjuntiva do esmalte (KATCHBURIAN, 2012). Atualmente, são reconhecidos dois grupos de proteínas da matriz do esmalte, as **amelogeninas** (~25 kDa) e suas isoformas, as mais abundantes e hidrofóbicas, e as **não-**

amelogeninas, categoria na qual se incluem as fosfoproteínas glicosiladas acídicas denominadas enamelina (~186 kDa) (BROOKES et al., 2011; HU et al., 1997) e tuftelina (~60 kDa) (ROBINSON; HUDSON, 2011), as glicoproteínas sulfatadas conhecidas como ameloblastina (~62 kDa) (LU et al., 2011; ZHANG; DIEKWISCH; LUAN, 2011). Recentemente foram identificadas e reconhecidas duas novas proteínas do esmalte, denominadas amelotina (~22 kDa) (IWASAKI et al., 2005) e apina (~30 kDa) (MOFFATT et al., 2008; PARK et al., 2007). Membros de pelo menos duas famílias gerais de proteases estão envolvidas no processamento e degradação extracelular das proteínas da matriz do esmalte. A enamelisina (MMP20), uma enzima da família das metaloproteases da matriz (MMP), está envolvida na degradação das principais proteínas estruturais da matriz do esmalte durante o estágio de secreção. Outra enzima da família das serina proteases, conhecida como kalikreina 4 (KLK4) é particularmente encontrada durante o estágio de maturação do esmalte. (BARTLETT; SIMMER, 1999; BARTLETT; SMITH, 2013; CATERINA et al., 2002; CHUN et al., 2010; HU, Y. et al., 2011; IWATA et al., 2007; LU, Y. et al., 2008; NAGANO et al., 2009; YAMAKOSHI et al., 2011).

A amelogênese pode ser perturbada por vários fatores, resultando na formação de um esmalte defeituoso. Dentre eles, destaca-se a ingestão excessiva de fluoreto (F) durante a amelogênese, a partir de várias fontes como água de abastecimento público, dentifrícios, suplementos, alimentos e bebidas (BUZALAF; LEVY, 2011), que leva a um defeito conhecido como fluorose dentária. O F é um agente comprovadamente eficaz no controle da cárie dentária. Até meados do século passado, acreditava-se que para que o máximo efeito cariostático fosse exercido, o F deveria ser incorporado à estrutura do esmalte durante o seu desenvolvimento. Hoje se sabe que a principal ação do F é tópica, inibindo a desmineralização e acelerando a remineralização do esmalte (BUZALAF et al., 2011). Diante disto surgiu a possibilidade de se obter o máximo do potencial preventivo do F, sem necessidade de ingestão, desta forma evitando ou reduzindo a ocorrência de fluorose dentária, cuja prevalência aumentou em algumas populações (KHAN; MOOLA; CLEATON-JONES, 2005).

O mecanismo pelo qual a ingestão excessiva de F durante a amelogênese leva à fluorose dentária ainda não é precisamente conhecido, sendo motivo de discussão na literatura. O dente fluorótico é caracterizado por hipomineralização de subsuperfície, pelo fato de haver um aumento dose-dependente na retenção de amelogeninas no início do estágio de maturação, com consequente redução do conteúdo mineral do esmalte. Isto parece ocorrer em função do atraso na remoção das amelogeninas, conforme ocorre a maturação do esmalte.

(BUZALAF; LEVY, 2011; DENBESTEN, 1986; DENBESTEN, P.K. et al., 1992; DENBESTEN et al., 2011). Tem sido relatado, pelo menos *in vitro*, que quando o F é incorporado ao mineral, mais proteínas se ligam ao mineral em formação. Ao mesmo tempo, a remoção destas proteínas pelas proteases é retardada, sugerindo alterações no padrão de interação entre proteína e mineral. Em adição, o F também parece aumentar a precipitação mineral nos dentes em formação, resultando em bandas de hipermineralizadas de esmalte, seguidas por bandas hipominealizadas. Nestas áreas onde ocorrem aumentos na precipitação mineral, existe também um aumento na acidez da matriz, o que leva à redução dose-dependente nos ciclos de modulação dos ameloblastos do estágio de maturação. Têm sido relatados ainda efeitos celulares específicos do F, mas mais pesquisas são necessárias para se determinar quais destas alterações são relevantes para a formação do dente fluorótico (DENBESTEN; LI, 2011). Entretanto, os mecanismos moleculares específicos que levam à fluorose dentária estão longe de serem conhecidos.

Observações epidemiológicas de grande variação na prevalência e severidade da fluorose em indivíduos com ingestão aparentemente similar de F (BUZALAF; WHITFORD, 2011; MABELYA et al., 1994; YODER et al., 1998), bem como estudos mostrando diferentes graus de susceptibilidade à fluorose entre certos grupos étnicos (BUTLER; SEGRETO; COLLINS, 1985; RUSSELL, 1962; WILLIAMS; ZWEMER, 1990) levaram à pressuposição de que a susceptibilidade à fluorose dentária poderia ser geneticamente determinada. Esta possibilidade de susceptibilidade genética à fluorose foi estudada utilizando-se camundongos como modelo experimental, sendo que o genótipo, a idade, o gênero, a alimentação e os níveis de F na água de consumo dos animais foram rigorosamente controlados (EVERETT et al., 2002). Observou-se diferença na susceptibilidade e resistência à fluorose dentária entre as 12 linhagens de camundongos estudadas. A linhagem de camundongos A/J mostrou-se ser altamente susceptível, com um rápido e severo desenvolvimento da fluorose dentária quando comparada com as outras linhagens testadas, enquanto que, a linhagem de camundongos 129P3/J mostrou-se pouco afetada, apresentando uma fluorose dentária leve. Neste estudo, o acúmulo de F nos fêmures e nos incisivos foi avaliado como indicador da exposição ao F. Os resultados demonstraram que houve uma correlação significativa entre a concentração de F na água de consumo e a concentração de F nos fêmures, bem como entre a concentração de F na água e a concentração de F nos incisivos. Além disso, todos os camundongos acumularam quantidades similares de F nos fêmures e nos incisivos, independente do grau de fluorose que apresentaram. Esse fato levou os autores a sugerir que a eliminação do F pelo organismo não é uma explicação suficiente para a resistência à fluorose dentária. Posteriormente, um estudo

metabólico mostrou que, contrariamente ao que era esperado, os animais da linhagem 129P3/J retêm mais F no organismo, o que faz seus níveis de F no fêmur e plasma serem maiores que aqueles encontrados nos animais da linhagem A/J. Esse achado é surpreendente, uma vez que a despeito dos maiores níveis circulantes de F, os animais da linhagem 129P3/J mostraram-se resistentes à fluorose dentária, que não se manifestou mesmo com a ingestão de água contendo 50 mg/L de F (CARVALHO et al., 2009). Entretanto, os mecanismos moleculares envolvidos nos diferentes efeitos do F no esmalte dentário, influenciados pela genética, ainda são desconhecidos.

Quando se deseja elucidar os mecanismos moleculares envolvidos em uma patologia ou no seu tratamento, a análise proteômica emerge como uma importante ferramenta. A proteômica é um dos vários campos “ÔMICOS” que vem trazendo grandes avanços na era pós-genômica. É considerada como uma área da Ciência, que analisa as proteínas em larga escala, contribuindo para o entendimento das distintas funções desempenhadas pelos diversos genes de um certo organismo (PANDEY; MANN, 2000; ZHANG et al., 2010). O proteoma é o conjunto de todas as proteínas expressas em uma célula, tecido ou organismo em um dado momento, sendo esse sistema, constantemente alterado pelas interações bioquímicas observadas entre os fatores genéticos e ambientais (COLUCCI-D'AMATO et al., 2011; PORTEUS et al., 2011). A análise proteômica fornece informações globais sobre a expressão de proteínas, suas concentrações relativas e possíveis modificações pós-traducionais que possam vir a sofrer ao longo do seu desenvolvimento (PANDEY; MANN, 2000; SCHULZE; USADEL, 2010). Numa das abordagens mais comuns em proteômica quantitativa, emprega-se a eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (2D-PAGE) para separar e comparar as proteínas presentes em amostras biológicas, seguida de identificação por espectrometria de massas (MS), em combinação com ferramentas de bioinformática (ISSAQ; VEENSTRA, 2008).

Como descrito anteriormente, diversas proteínas interagem durante a amelogenese. Entretanto, essas proteínas nunca foram avaliadas em animais com diferentes susceptibilidades à fluorose dentária. Dessa maneira, é bastante provável que a análise da sua expressão diferencial em camundongos susceptíveis ou resistentes à fluorose dentária, expostos cronicamente a diferentes níveis de F, possa contribuir para a elucidação dos mecanismos envolvidos na patogênese e na susceptibilidade e resistência à fluorose dentária. Diante desse aspecto, o método de escolha para as investigações iniciais é a análise proteômica, pois permite a detecção de alterações na expressão de múltiplas proteínas simultaneamente.

Revisão de Literatura

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 AMELOGÊNESE

A natureza cristalina do esmalte se deve ao seu alto conteúdo inorgânico (97%), na forma de apatita, com quantidades de carbonato, sódio, magnésio, cloreto, potássio e F em meio a 1% de material orgânico de natureza basicamente proteica, com escasso teor de carboidratos e lipídios, contendo ainda 2% de água (KATCHBURIAN, 2012). O alto conteúdo mineral torna o esmalte extremamente duro, propriedade que, junto com a sua complexa organização estrutural, permite que este tecido resista às forças mecânicas aplicadas durante a sua função. A formação do esmalte é um processo complexo que envolve a proliferação e diferenciação celular através de interações epitélio-mesenquimais sequenciais (SMITH, 1998), secreção de proteínas de matriz tecido-específicas (BARTLETT et al., 2006a), transporte de íons, incluindo cálcio e F, e precipitação e alinhamento dos cristais do esmalte através de interações entre moléculas orgânicas e inorgânicas (AOBA; FEJERSKOV, 2002). A progressão desses processos é realizada pelo suprimento da circulação sanguínea, que transporta todos os íons para dentro do microambiente do fluido do esmalte (AOBA; MORENO, 1987). Portanto, faz-se necessário o correto entendimento acerca desse complexo processo e as principais características observadas durante a formação do esmalte dentário.

2.1.1 Estágios da amelogênese

Os eventos mais importantes da amelogênese são a secreção da matriz orgânica rica em proteínas e água pelos ameloblastos no estágio de secreção e, a subsequente mineralização dessa matriz com a remoção das proteínas e da água no estágio de maturação. Do ponto de vista das alterações morfológicas e funcionais, a amelogênese é descrita em três estágios principais, denominados estágio pré-secretor, secretor e de maturação. Em termos gerais, o estágio pré-secretor é considerado como um estágio que antecede a deposição da matriz do esmalte, onde os ameloblastos se diferenciam adquirindo um extenso aparato sintetizador de proteínas. Logo em seguida, o estágio secretor se caracteriza pela deposição e mineralização parcial da matriz do esmalte pelos ameloblastos, que elabora e organiza toda a espessura do esmalte. E por fim, o estágio de maturação é marcado pela remoção das proteínas, acompanhada pelo aumento gradativo da mineralização do esmalte, até que atinja seu estado maduro (GERLACH; LINE, 2005). Esse processo é marcado pelo transporte de íons específicos necessários para o concomitante acréscimo de minerais e caracterizado pela

modulação cíclica dos ameloblastos que apresentam ora borda pregueada, ora borda lisa (JOSEPHSEN; FEJERSKOV, 1977; JOSEPHSEN et al., 2010).

Durante o estágio secretor, importantes processos são observados podendo influenciar diretamente tanto no correto desenvolvimento da mineralização do esmalte quanto na sua alteração de estrutura. Os cristais de hidroxiapatita são depositados na matriz orgânica, formando placas finas e alongadas, dispostas paralelamente entre si, estendendo-se desde a junção amelodentinária até à frente de mineralização próximo da membrana celular dos ameloblastos, sendo que nessa frente de mineralização começa a deposição dos minerais (RAUTH et al., 2009; SIMMER; HU, 2001). Após depositarem a camada de esmalte aprismático, isto é, sem prismas de esmalte, os ameloblastos secretores desenvolvem nas suas porções terminais um processo conóide, denominado processo de Tomes (SIMMER; HU, 2001). À medida em que os ameloblastos vão secretando as proteínas da matriz, os cristais de hidroxiapatita continuam a crescer em comprimento (LACRUZ et al., 2010b; RAUTH et al., 2009; SIMMER; HU, 2001). A partir de então, o processo de Tomes organiza os cristais em esmalte prismático e interprismático. Os cristais que se alongam perto das extremidades do processo de Tomes, formam o esmalte prismático. Entretanto, os cristais que se alongam junto às junções intercelulares, formam o esmalte interprismático. Nota-se que entre esses dois tipos de esmalte existe um limite nítido, pois parte da membrana dos ameloblastos é descrita como sendo “não secretora”, o que cria uma fenda na frente de mineralização. Assim, o esmalte prismático e interprismático diferem entre si apenas pela orientação dos seus cristais (SIMMER; HU, 2001; SMITH, 1998).

Durante o estágio de secreção, os cristais não crescem em comprimento continuamente, mas sim por incrementos e, cada incremento representa a quantidade de cristal que cresceu em comprimento num único dia, sendo manifestado estruturalmente como estrias. As estrias mais proeminentes são as estrias de Retzius ou linhas incrementais, que ocorrem num período regular de tempo (SIMMER; HU, 2001). O alongamento dos cristais de hidroxiapatita é orquestrado pelas proteínas da matriz do esmalte. Sabe-se que os ameloblastos continuam a secretar matriz orgânica até um certo ponto, quando deixam de ser produzidas proteínas estruturais (amelogenina, ameloblastina, enamelin) e passam a ser secretadas proteases (MMP20), com função de degradação da matriz orgânica. Assim, observa-se a finalização do crescimento dos cristais em comprimento e, distúrbios ocorridos durante o estágio secretor, resultarão em um esmalte mais fino ou hipoplásico, devido a um insuficiente alongamento dos cristais (SIMMER; HU, 2001).

A amelogênese é considerada um processo de desenvolvimento bastante lento, que

pode levar cerca de cinco anos para se completar na coroa de alguns dentes na dentição humana permanente, e mais de dois terços do tempo de formação são ocupados pelo estágio de maturação. Embora os ameloblastos do estágio de maturação sejam genericamente denominados de células pós-secretoras, esses ainda sintetizam e secretam proteínas, pelo menos durante as fases iniciais desse estágio. As mudanças observadas nas propriedades físico-químicas do esmalte previamente à sua erupção na cavidade oral são resultado do crescimento em largura e espessura dos cristais no estágio de maturação do esmalte (KATCHBURIAN, 2012).

A principal atividade dos ameloblastos do estágio de maturação, está na remoção de água e conteúdo proteico, para permitir a introdução de material inorgânico adicional. A atividade mais bem visualizada dessas células é a modulação cíclica que consiste na perda e recriação de uma terminação rugosa com superfície apical invaginada, isto é, as células alternam em possuir uma borda pregueada (terminação rugosa) ou uma borda lisa (terminação lisa) (GERLACH; LINE, 2005; SMITH, 1998). Destaca-se que, esses dois tipos morfológicos não refletem distintos ameloblastos. O que se observa é que um mesmo grupo de ameloblastos se modifica ciclicamente induzindo à essas modificações (GERLACH; LINE, 2005).

Além de morfológicamente distintos em relação à borda apical, os ameloblastos de borda pregueada ou borda lisa também são diferentes em relação às junções celulares, morfologia da região lateral e quanto ao pH da matriz à qual estão aderidos (ATHANASSIOU-PAPAEFTHYMIOU et al., 2011; BARTLETT; SMITH, 2013; LACRUZ et al., 2012a; LACRUZ et al., 2010b; SIMMER; FINCHAM, 1995; SIMMER; HU, 2001; SMITH, 1998). As junções celulares nos ameloblastos parecem ter um papel importante na formação do esmalte. No estágio secretor, há junções comunicantes entre os ameloblastos e células do estrato intermediário (vias de transporte de nutrientes e íons) e entre os ameloblastos adjacentes (possivelmente vias de sinalizações). No estágio de maturação, os ameloblastos também apresentam junções comunicantes e desmossomos (BARTLETT; SMITH, 2013). Tem sido demonstrado que os ameloblastos em algumas espécies modulam rapidamente, com a frequência de uma vez a cada oito horas, produzindo desse modo, três modulações completas por dia (NANCI, 2008). A significância das modulações ainda não é precisamente conhecida. Acredita-se que estejam relacionadas com a manutenção de um ambiente que permite o acréscimo do conteúdo de minerais e a perda de matriz orgânica, em parte através das alterações da permeabilidade do órgão do esmalte. Foi proposto que a acidificação do microambiente do esmalte associada ao acréscimo mineral progressivo

durante a maturação, leva os ameloblastos com borda pregueada, a produzir íons bicarbonato, alcalinizando o fluido do esmalte para prevenir desmineralização reversa dos cristais em formação, e manter as condições de pH otimizadas para o funcionamento das enzimas de degradação da matriz que apresentam alta atividade em condições ligeiramente ácidas (LACRUZ et al., 2010b; SIMMER; FINCHAM, 1995; SIMMER; HU, 2001; SMITH, 1998). Os ameloblastos com borda rugosa mostram uma considerável atividade endocítica e possuem numerosos lisossomas, proteínas ligantes de cálcio e cálcio-adenosinotrfosfatase associadas à membrana, com função de promover o bombeamento de íons cálcio para o esmalte em maturação. Já os ameloblastos com borda lisa permitem a passagem de pequenas proteínas e outras moléculas, mostram pouca atividade endocítica e quase não possuem atividade da cálcio-adenosinotrfosfatase (GERLACH; LINE, 2005).

Estudos experimentais têm demonstrado que os aspectos físico-químicos da superfície do esmalte sob os ameloblastos de borda pregueada são diferentes daqueles sob os ameloblastos com borda lisa (JOSEPHSEN; FEJERSKOV, 1977; JOSEPHSEN et al., 2010). Nota-se que a matriz é mais hidratada nas regiões sob os ameloblastos com borda lisa, enquanto há muito cálcio localizado nas regiões subjacentes a ameloblastos com borda pregueada. Em adição, o fluido do esmalte das regiões subjacentes aos ameloblastos com borda lisa possui pH entre 7,2 e 7,4, enquanto o fluido de áreas com ameloblastos de borda pregueada apresenta pH entre 6,1 e 6,8 (GERLACH; LINE, 2005).

Sabe-se que os minerais se formam na própria matriz do esmalte em mineralização a partir de condições ideais. A fórmula da unidade básica da hidroxiapatita é $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. A reação de formação da hidroxiapatita $[10 \text{Ca}^{+2} + 6 \text{HPO}_4^{-2} + 2 \text{H}_2\text{O} \Leftrightarrow \text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2 + 8 \text{H}^+]$ resulta em um número substancial de prótons que precisam ser neutralizados. Os fosfatos que formam a hidroxiapatita são obtidos a partir de fosfatos monoácidos, enquanto que as hidroxilas são obtidas a partir da água (GERLACH; LINE, 2005). Esses achados permitiram concluir que a deposição de hidroxiapatita libera prótons que podem dissolver a hidroxiapatita na ausência de outros tampões, pois, os fosfatos incorporam prótons movendo a reação no sentido inverso. Assim, deduziu-se que a mineralização potencialmente diminui o pH do fluido do esmalte, pois, oito prótons (H^+) são liberados para cada unidade de hidroxiapatita formada (LACRUZ et al., 2010b). Não está totalmente estabelecido qual o sistema responsável por tamponar esse ácido produzido durante a mineralização, porém, parece que os ameloblastos com borda pregueada secretariam bicarbonato, fazendo com que o fluido do esmalte realize trocas com o soro. A manutenção de barreiras impermeáveis nos ameloblastos do estágio de maturação induziria uma acidificação por represar o ácido que está

sendo formado na matriz durante a mineralização. Em adição, sugeriu-se que se o fosfato da hidroxiapatita for utilizado como tampão, cada vez que o pH diminuir em uma unidade haverá um aumento de 10 vezes na solubilidade do esmalte (SIMMER; HU, 2001). Tem sido verificado que a mobilização de minerais pelos ameloblastos está também na dependência do correto suprimento de oxigênio (O₂), pois os ameloblastos são células extremamente sensíveis a privações de O₂ (FEARNE et al., 1990) e a sua função pode ser alterada caso tal evento aconteça (VELLO et al., 2010).

Dessa forma, é notório que o ambiente que circunda os cristais do esmalte e os processos químicos envolvidos no seu crescimento são perfeitamente regulados pelos ameloblastos (LACRUZ et al., 2010b; PAINE et al., 2001). Sabe-se que a secreção das proteínas da matriz do esmalte e o crescimento dos cristais são considerados um processo contínuo e simultâneo. Quando o crescimento aposicional do esmalte se completa, os componentes orgânicos do tecido são removidos enzimaticamente (BARTLETT; SIMMER, 1999). Os espaços que originalmente continham água e proteínas da matriz são então preenchidos, havendo por consequência o aumento em largura e espessura dos cristais do esmalte (SMITH, 1998). O processo de formação do esmalte requer o controle rigoroso do pH extracelular e da concentração de bicarbonato (LACRUZ et al., 2010b; SASAKI, S.; TAKAGI; SUZUKI, 1991; SMITH, 1998). O crescimento dos cristais e as atividades das proteases nos compartimentos extracelulares são considerados fenômenos pH-dependentes, requerendo rigoroso controle do fluido do pH extracelular durante os processos de transportes celulares (TAKAGI et al., 1998). No entanto, estudos têm sido realizados para tentar esclarecer exatamente o que ocorre no processo de regulação do pH extracelular e os mecanismos envolvidos na sua homeostase durante o processo de crescimento dos cristais.

2.1.2 Matriz orgânica do esmalte

O perfil eletroforético de todo o homogenato do esmalte imaturo é bastante complexo. Muitos estudos realizados em modelos animais experimentais proporcionaram uma boa caracterização da matriz orgânica do esmalte em formação (BANSAL et al., 2012; BARTLETT; SMITH, 2013; LACRUZ et al., 2013; LACRUZ et al., 2012a; TIAN et al., 2012). Das proteínas que constituem a matriz do esmalte, 90% formam um grupo heterogêneo de proteínas de baixa massa molecular conhecidas como **amelogeninas**. Os 10% restantes consistem em proteínas **não-amelogeninas**, como as ameloblastinas, enamelinas e tuftelinas. Esse percentual de proteínas desempenha funções cruciais que permitem o correto

desenvolvimento do esmalte. Diversos estudos vêm sendo conduzidos na tentativa de se conhecer estas proteínas e a função que as mesmas exercem na formação do esmalte.

Durante a amelogenese, as proteínas do esmalte interagem entre si e com os cristais de hidroxiapatita no intuito de criar um biomineral estruturalmente organizado (LACRUZ et al., 2010b; WANG et al., 2005). Dentre essas, as mais abundantes da matriz orgânica, as **amelogeninas** (AMELs), representam a principal proteína estrutural envolvida na formação do esmalte e sua expressão é interrompida quando o esmalte atinge toda a sua espessura. Essas proteínas são predominantemente hidrofóbicas, possuindo curtas regiões hidrofílicas (apenas em suas extremidades) (PUGACH et al., 2010), são ricas em prolina, histidina e glutamina (FINCHAM et al., 1991), apresentam poucas modificações pós-traducionais e massa molecular relativamente baixa (~25 kDa). A heterogeneidade das AMELs pode ser explicada por uma combinação de fatores. Primeiro, os genes responsáveis pela transcrição da AMEL são encontrados nos cromossomos X e Y e, como esses dois genes não são 100% homólogos, existe a hipótese da heterogeneidade sexual. Segundo, o gene da AMEL contém vários éxons que podem ser agrupados de diferentes maneiras para produzir mRNAs maduros que podem incluir todos os éxons ou perder alguns deles, produzindo diversas isoformas. Terceiro, as AMELs sofrem processamento extracelular de curto e longo prazo por enzimas proteolíticas, originando fragmentos de massa molecular mais baixo (BANSAL et al., 2012; FINCHAM et al., 1991; FINCHAM et al., 1995; GALLON et al., 2013; HUANG et al., 2012; LACRUZ et al., 2012a; MORADIAN-OLDAK, 2001, 2012; PUGACH et al., 2010; STAHL et al., 2013; ZHENG et al., 2013).

Estudos têm revelado que as AMELs, em meio aquoso como o fluido do esmalte, formam agregados conhecidos como nanosferas pelas interações das regiões hidrofóbicas, enquanto que a sua porção hidrofílica se prenderia às regiões laterais dos cristais durante a precipitação (FINCHAM et al., 1995; YANG, X. et al., 2010). Além disso, as AMELs possuem um domínio semelhante à lectina, que poderia mantê-las orientadas em direção à face secretora do processo de Tomes, o que orientaria espacialmente as nanosferas e, em última instância, os cristais que se precipitariam nos espaços livres de proteínas. De acordo com esse modelo, as proteínas e os minerais são depositados simultaneamente já no início do estágio secretor. Os ameloblastos migrariam deixando para trás as proteínas, que formariam os agregados. Esse arcabouço proteico favoreceria o crescimento da maior parte dos cristais no sentido do eixo de migração dos ameloblastos, por ocupar espaços entre os cristais (GERLACH; LINE, 2005). Esse modelo também permite sugerir que os cristais finos e alongados possam receber incrementos de mineral nas suas regiões laterais à medida em que

os agregados proteicos hidrofóbicos forem removidos por proteólise (FINCHAM; MORADIAN-OLDAK, 1995; MORADIAN-OLDAK, 2001). Verificou-se também que a solubilidade das AMELs depende da sua estrutura primária, pH e força iônica da solução, sendo que a baixa solubilidade das amelogeninas em condições fisiológicas pode resultar da tendência delas de formar estruturas quaternárias (agregados) *in vivo* (TAN et al., 1998).

Várias outras proteínas da matriz do esmalte dão grande contribuição ao processo de estruturação do esmalte dentário. Dentre elas, a **ameloblastina** (AMBN) (LU et al., 2011; RAVINDRANATH et al., 2004; SMITH et al., 2009) e a **enamelina** (ENAM) (SMITH et al., 2009) são os membros mais bem estudados da família das não-amelogeninas. Sua contribuição no processo de mineralização do esmalte em formação tem sido extensamente discutido (IIJIMA et al., 2010).

A AMBN é uma proteína glicosilada, proteoliticamente degradada na sua extremidade N-terminal pouco tempo depois da sua secreção na matriz do esmalte. Os produtos dessa degradação, que contêm o C-terminal, desaparecem rapidamente sendo apenas detectados apenas nos 30 μ m da superfície do esmalte em desenvolvimento e apenas no esmalte bastão e interbastão. No entanto, os produtos de degradação que não contêm o C-terminal se acumulam na bainha do bastão em toda a espessura do esmalte em desenvolvimento, sendo relativamente ausentes no esmalte bastão e interbastão (SIMMER; HU, 2001). Acredita-se que a AMBN auxilie a adesão dos ameloblastos na superfície do esmalte em formação durante o estágio secretor (LU et al., 2011; RAVINDRANATH et al., 2004; SMITH et al., 2009).

A ENAM (BROOKES et al., 2011; HU et al., 1997) é a maior proteína da matriz do esmalte e, cerca de 1/3 da sua massa molecular é derivada de glicosilações. Essa proteína intacta, está limitada ao fronte de mineralização, o que explica o seu envolvimento direto no processo de alongamento dos cristais de hidroxiapatita (BOUROPOULOS; MORADIAN-OLDAK, 2004). A ENAM é primeiramente degradada proteoliticamente próximo ao seu C-terminal. A maioria dos seus produtos de degradação são instáveis e não se acumulam na matriz do esmalte. Aqueles que se acumulam ficam localizados no esmalte bastão e interbastão da junção amelodentinária até a superfície do esmalte e são relativamente ausentes no espaço da bainha (SIMMER; HU, 2001). Em adição, foi verificado que a expressão da ENAM é essencial para a adequada mineralização da matriz do esmalte, atuando como moduladora da formação dos minerais e promovendo o alongamento dos cristais (HU et al., 2008; MASUYA et al., 2005). Estudos têm demonstrado que os genes responsáveis pela ENAM e AMBN estão localizados no cromossomo 4q, em uma região que está associada à

amelogênese imperfeita (AI), sugerindo-se que essas proteínas são candidatas às formas autossômicas da AI (HU et al., 2008; PAINE et al., 2003).

Morfologicamente, a matriz orgânica do esmalte imaturo em formação aparece uniforme em espécimes histológicos descalcificados. Entretanto, análises imunohistoquímicas revelaram que as proteínas do esmalte são diferencialmente distribuídas através das camadas de esmalte. As moléculas de proteínas não-amelogeninas intactas ou relativamente intactas, como a AMBN, estão concentradas próximo à superfície celular nos sítios em que são secretadas, ao passo que a maioria dos seus fragmentos de degradação é encontrado nas camadas mais profundas do esmalte. Os sítios onde a AMBN é mais concentrada correspondem à posição do esmalte onde ocorreu o crescimento dos cristais em comprimento (ZALZAL; SMITH; NANCI, 2008). Entretanto, contrariamente às AMBNs, as formas intactas e fragmentadas das AMELs são menos concentradas nos sítios de crescimento e são encontradas abundantemente ao longo da camada de esmalte. Um fator importante a ser destacado é que as AMELs e AMBNs são sintetizadas simultaneamente e estão contidas dentro dos mesmos grânulos de secreção. Uma vez que essas proteínas são co-secretadas, sua secreção nos sítios de crescimento é intrigante e pode resultar das condições do microambiente, das propriedades físico-químicas das proteínas ou de algum atributo especial dos grânulos de secreção (ZALZAL; SMITH; NANCI, 2008). Acredita-se que as AMELs formem agregados supramoleculares denominados nanosferas (YANG et al., 2010), que circundam os cristais ao longo de sua extensão e que são visíveis em cortes de esmalte observados ao microscópio eletrônico como material granular de fundo entre os cristais. Com base nas características bioquímicas e na distribuição diferencial das variadas proteínas do esmalte, acredita-se que membros da família não-amelogenina promovem e guiam largamente a formação dos cristais, enquanto as AMELs regulam o crescimento em espessura e em largura dos cristais. As AMELs impedem que os cristais se fusionem durante as sua formação, porém, devem ser removidas para permitir o crescimento posterior destes.

A **tuftelina** (TUFT) é uma proteína não-amelogenina expressa em diferentes tecidos, como o ósseo e cartilaginoso (DIEKWISCH et al., 1997; LUO et al., 2004). Estudos têm classificado as TUFTs como sendo proteínas associadas à lâmina basal que recobre o esmalte em maturação e o esmalte maduro pré-eruptivo. Em adição, autores identificaram através de análises imunohistoquímicas as TUFTs entre os odontoblastos no início do estágio de secreção, e com o avançar do processo migraram em direção à junção amelodentinária (DIEKWISCH et al., 1997). Diante desses achados, nesse mesmo estudo os autores sugeriram que as TUFTs poderiam ser secretadas pelos odontoblastos e penetrariam no esmalte, via

prolongamentos, para dar suporte ao processo de nucleação dos cristais. Uma sugestão alternativa seria a secreção das TUFTs pelos ameloblastos, seguida de sua migração para a matriz dentinária (DIEKWISCH et al., 1997).

Mesmo havendo consenso a respeito das particularidades encontradas nas principais proteínas estruturais da matriz orgânica do esmalte, ainda são questionadas suas funções durante todo o processo de formação do esmalte. Assim, a nucleação dos cristais tem sido atribuída à TUFT, o controle do crescimento dos cristais à AMEL, ENAM e AMBN, o apoio e sustentação do crescimento dos cristais à AMEL e ENAM, a determinação da estrutura prismática à AMBN, a sinalização celular à TUFT e AMBN e o controle da secreção de produtos de degradação e a proteção da fase mineral à AMEL e ENAM. Esses achados apresentam uma importante contribuição para o desenvolvimento de estudos subsequentes visando à elucidação dos eventos envolvidos na formação do esmalte (ROBINSON et al., 1998).

O foco atual tem sido identificar produtos dos ameloblastos secretados na camada de esmalte, que apresentem algum impacto na formação, estruturação e no crescimento dos cristais. Desse modo, esforços mais recentes levaram à identificação de novas proteínas secretadas pelos ameloblastos em estágio de maturação (IWASAKI et al., 2005; MOFFATT et al., 2006a). Duas dessas proteínas foram descritas na última década, a **amelotina** (AMTN) (IWASAKI et al., 2005) e a **apina** (APIN) (MOFFATT et al., 2008; PARK et al., 2007).

A AMTN está presente na lâmina basal que forma a interface entre os ameloblastos e o esmalte em maturação (MOFFATT et al., 2006b). Estudos têm relatado que a AMTN apresenta pouca ou nenhuma modificação pós-traducional (IWASAKI et al., 2005). Apesar de inicialmente ter sido identificada nos estágios de transição/maturação da amelogênese (IWASAKI et al., 2005), um estudo recente (LACRUZ et al., 2012b) avaliando a superexpressão da AMTN em camundongos transgênicos, revelou através da utilização de *western blot* e imunohistoquímica, sua expressão nos estágios de secreção da amelogênese. Nesse estudo, observou-se que a aparência histológica dos ameloblastos e suas estruturas celulares, bem como a expressão de importantes proteínas relacionadas com a estruturação do esmalte (AMEL, AMBN), não foram alteradas pela superexpressão da AMTN, sugerindo que a produção, processamento e secreção dessas proteínas ocorreram normalmente nos camundongos transgênicos. No entanto, o esmalte dos camundongos transgênicos apresentou-se mais fino, exibindo uma estrutura de superfície altamente irregular em relação àquele da linhagem selvagem. Os dentes dos animais transgênicos foram então submetidos à análise de dureza (Knoop), que confirmou uma menor resistência da camada de esmalte. Os resultados

revelaram uma microestrutura do esmalte completamente desorganizada, levando os autores a concluir que a superexpressão da AMTN promove a perturbação da estrutura do esmalte durante a formação do processo de Tomes, desorganizando, portanto, o crescimento dos prismas de esmalte (esmalte bastão e interbastão) (LACRUZ et al., 2012b). Outros estudos têm apontado que, devido à sua localização (interface esmalte-ameloblasto), é possível que a AMTN possa ter uma função de regulação do pH e modulação do transporte de íons durante a remoção da matriz orgânica e subsequente mineralização do esmalte (SOMOGYI-GANSS et al., 2012).

A APIN, descrita na literatura como sendo uma longa proteína contendo ~153 aminoácidos na sua composição (SOLOMON et al., 2003) foi isolada do amilóide de tumores epiteliais odontogênicos calcificados (MOFFATT et al., 2008; PARK et al., 2007). Trata-se de uma proteína ácida, rica em glutamina e prolina, fortemente expressa pelos ameloblastos do estágio de maturação (MOFFATT et al., 2006a; MOFFATT et al., 2008; PARK et al., 2007). A localização exata da APIN ainda necessita ser investigada; entretanto, verificou-se sua presença na matriz do esmalte depositada adjacientemente ao processo de Tomes durante o estágio de secreção do esmalte (PARK et al., 2007). Em adição, tem sido sugerido a sua expressão e localização durante a diferenciação dos ameloblastos de incisivos de ratos, utilizando-se como ferramentas de análise hibridização *in situ* e imunohistoquímica (PARK et al., 2007). Nesse estudo, os resultados demonstraram que a APIN não estava expressa em pré-ameloblastos, apresentou-se fracamente expressa em ameloblastos secretores, fortemente expressa em ameloblastos do estágio de maturação e presente no epitélio juncional do esmalte. Nos ameloblastos com borda pregueada do estágio de maturação, a APIN foi fortemente observada. No entanto, a superexpressão e inativação causou um aumento e diminuição das MMP20 e da TUFT, respectivamente. Esses resultados indicam um papel funcional da APIN na mineralização e maturação do esmalte, mediada pela expressão de MMP20 e TUFT (MOFFATT et al., 2008; PARK et al., 2007). Posteriormente, após confirmação da expressão da APIN como sendo uma proteína secretada pelo órgão do esmalte (OE) de incisivos de rato, um estudo subsequente foi realizado com o objetivo de caracterizar ainda mais a APIN em várias espécies, avaliando a sua especificidade nos tecidos e sua localização no OE (MOFFATT et al., 2008). Os resultados mostraram que a expressão da APIN era elevada em OE e gengiva, moderada nas glândulas salivares e nasais, e mais baixa no epidídimo. Nesse mesmo estudo, observou-se que a APIN é altamente conservada em mamíferos, mas ausente em peixes, aves e anfíbios. É uma proteína que apresenta modificação pós-traducional, consistindo com a presença de sítios de fosforilação e

glicosilações. Foi detectada nos estágios de transição/maturação de ameloblastos do OE de incisivos de roedores, apresentando intensa marcação na região do complexo de Golgi, bem como sobre os ápices dos ameloblastos próximos da matriz do esmalte. Em adição, também foi imunodetectada em células epiteliais das gengivas, que se ligam a superfície do dente (epitélio juncional). A presença da APIN na interface entre células e dente sugere envolvimento em mecanismos adesivos nesses locais, mas a sua presença em outros tecidos epiteliais indica que essa proteína provavelmente possui funções fisiológicas mais amplas (PARK et al., 2007). Diante disso, essas duas proteínas (AMTN e APIN) são co-expressas e estão associadas à superfície apical de ameloblastos moduladores, podendo mediar a adesão do órgão do esmalte à superfície do esmalte (LACRUZ et al., 2012b; MOFFATT et al., 2008; MOFFATT et al., 2006b; PARK et al., 2007). Essas proteínas também são expressas no epitélio juncional, onde a adesão celular à superfície do dente exerce um importante papel na manutenção da saúde e integridade periodontal (MOFFATT et al., 2008; PARK et al., 2007).

A matriz extracelular do esmalte em desenvolvimento encontra-se atualmente bem definida em termos de seus principais componentes proteicos. Estudos atuais têm identificado uma infinidade de novos produtos gerados por genes, que parecem apresentar importantes funções no processo de formação do esmalte. Recentemente, um grupo de pesquisa realizou uma revisão de literatura sintetizando o conhecimento sobre alguns genes expressos por ameloblastos e suas funções na regulação do pH ao longo do processo de maturação do esmalte (LACRUZ et al., 2010b). Sabe-se que a maioria do conteúdo mineral é depositado durante o estágio de maturação do esmalte e, para tanto, os ameloblastos mobilizam os íons cálcio, fosfato e bicarbonato para a matriz, removendo a água. Nesse momento, o crescimento dos cristais é modulado por alterações no pH do microambiente do esmalte, que é crítico para uma adequada biomineralização (LACRUZ et al., 2010b). Evidências têm sugerido o envolvimento das proteínas **carbonic anhydrase (CAs)**, **cystic fibrosis conductance transmembrane regulator (CFTR)** e duas proteínas de membrana, incluindo a **anion exchanger (AE2)** e a **sodium bicarbonate cotransporter (NBCe1)**, no co-transporte e na produção de bicarbonato durante o crescimento dos cristais (LACRUZ et al., 2010b).

As CAs são proteínas que apresentam várias isoformas, em diversas localizações celulares e distribuições teciduais, atuando como catalizadoras na reação reversível do dióxido de carbono em bicarbonato [$\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$] (HEWETT-EMMETT; TASHIAN, 1996). Também participam de importantes processos biológicos, incluindo a homeostase do pH, transporte de CO_2 e HCO_3^- , calcificação/reabsorção óssea (SLY; HU, 1995; SUPURAN, 2008) e secreção de eletrólitos (LACRUZ et al., 2010a). As duas

isoformas mais relatadas em tecidos dentais são as CAs 2 e 6 (SMITH; NANCI; MOFFATT, 2006; TOYOSAWA et al., 1996). A CA2 é a isoforma mais amplamente expressa no citoplasma dos principais órgãos de mamíferos (PAN et al., 2006; PASTOREKOVA et al., 2004; SLY; HU, 1995). Com o avanço na identificação de proteínas ao longo dos anos, diversas isoformas de CAs foram sendo reconhecidas, dentre as quais, 16 são bastante estudadas (SUPURAN, 2008). Sugeriu-se então, que essas proteínas poderiam apresentar algum papel durante o processo de amelogenese. Diante desse aspecto, estudos comprovaram que pacientes com deficiência de CA2 apresentaram osteoporose, defeito de desenvolvimento do esmalte como a hipoplasia e maior susceptibilidade à cárie dentária (AWAD et al., 2002; LACRUZ et al., 2010a; NAGAI et al., 1997; STRISCIUGLIO et al., 1990).

O primeiro relato sobre a atividade da CA em tecidos dentários foi feito em homogeneizados de incisivos de ratos adultos (KONDO K; KURIAKI K; 1961). Posteriormente, análises histoquímicas de molares não-irrompidos de *hamsters*, verificaram sua expressão em ameloblastos mais maduros (DOGTEROM; BRONCKERS, 1983; SUGIMOTO et al., 1988). De acordo com esses estudos, o papel da CA é de fornecer íons aos sítios de mineralização no início do processo de nucleação dos cristais (KAKEI; NAKAHARA, 1996). Com o foco direcionado para a CA2, estudos avaliaram sua expressão nos ameloblastos do estágio de maturação (SUGIMOTO et al., 1988; TOYOSAWA et al., 1996). Resultados demonstraram que essa proteína se apresentava altamente expressa nos estágios de maturação, principalmente em ameloblastos de borda pregueada, quando comparada aos ameloblastos de borda lisa, confirmando a hipótese de que os ameloblastos de borda pregueada bombeiam prótons para realizar o transporte de H^+ no esmalte em maturação (LIN et al., 1994). Deve ser salientado, contudo, que apesar da maioria dos estudos confirmarem a expressão da CA2 nos estágios iniciais de maturação (SUGIMOTO et al., 1988; TOYOSAWA et al., 1996), outros trabalhos têm demonstrado sua expressão na diferenciação dos ameloblastos durante a via de sinalização mediada pela JNK (WANG et al., 2010) e, em ameloblastos do estágio de secreção (LACRUZ et al., 2010a; SMITH; NANCI; MOFFATT, 2006; WANG et al., 2010).

A CA6 foi originalmente descrita como uma glicoproteína encontrada na saliva humana e sua função pode estar relacionada à manutenção da homeostase do pH na cavidade bucal (LACRUZ et al., 2010a; SLY; HU, 1995). Destaca-se que essa proteína também foi identificada na película adquirida do esmalte (LACRUZ et al., 2010a; LEINONEN et al., 1999). Duas isoformas de CA6 têm sido relatadas (A e B) (SOK et al., 1999), porém, a tipo A é a mais encontrada em incisivos de ratos (SMITH; NANCI; MOFFATT, 2006). Um estudo

realizado em órgão do esmalte de incisivos de ratos em diferentes estágios de desenvolvimento demonstrou que a CA6 foi altamente expressa durante o estágio de maturação. Smith et al. (SMITH; NINCI; MOFFATT, 2006) postularam que a função da CA6 durante a maturação pode estar associada com o tamponamento local, fornecendo íons bicarbonato ou reciclando o excesso de ácido carbônico no processo de amelogênese.

Diversas pesquisas têm sido conduzidas para elucidar as principais funções desempenhadas pelas CAs diretamente nas células do esmalte. O aumento da produção de bicarbonato pela CA tem sido sugerido como uma das vias utilizadas pelos ameloblastos para regular o pH extracelular durante a formação do esmalte. Durante o estágios de maturação, células do órgão do esmalte expressam significantes níveis de CA2 e CA3 (CAs intracelulares), CA6 (secretada) e CA12 (de membranas) (JOSEPHSEN et al., 2010; LACRUZ et al., 2012c; LIN et al., 1994; SMITH; NINCI; MOFFATT, 2006; TOYOSAWA et al., 1996). No entanto, duas isoformas (CA2, CA6) têm sido extensamente estudada. Existem 16 diferentes isoformas de CAs identificadas em ratos, que englobam as localizadas no citoplasma, mitocôndrias e membrana plasmática. Dentre essas, 13 isoformas apresentam ação catalizadora, isto é, são enzimaticamente ativas, e 3 isoformas são consideradas não-catalíticas. Desse modo, realizou-se um estudo da expressão do RNA mensageiro (RNAm) da CA nas células do esmalte (LACRUZ et al., 2010a). Células epiteliais do órgão do esmalte foram isoladas a partir de molares de ratos recém-nascidos, de ameloblastos oriundos do estágio secretor da amelogênese, bem como da linhagem de ameloblastos LS8. O RNAm de todas as 16 isoformas de CAs foi observado nas células avaliadas, sendo que apenas a CA5, não foi encontrada em células do epitélio do OE secretoras. Os resultados mostraram que todas as isoformas de CAs são expressas por células epitélio do OE/ameloblastos *in vivo*. A superexpressão de CAs por ameloblastos contribui para a compreensão da homeostase do pH durante o desenvolvimento do esmalte e demonstra sua complexidade (LACRUZ et al., 2010a).

Sabe-se que o esmalte apresenta níveis relativamente elevados de cloreto (RETIEF et al., 1971). O papel exato do cloreto no desenvolvimento do esmalte continua sob investigação. No entanto, estudos têm sugerido que a sua função pode estar relacionada com o crescimento dos cristais, agindo como um transportador de cátions (BRONCKERS, A. et al., 2010). Relatos confirmaram que distúrbios na circulação de cloreto nas células epiteliais, resulta em uma anormalidade denominada fibrose cística (CF), e anormalidades dentais quando avaliadas em estudos experimentais animais (BRONCKERS et al., 2010; PRIMOSCH, 1980b, 1980a; WRIGHT; HALL; GRUBB, 1996; WRIGHT et al., 1996b). A

CF é uma doença hereditária autossômica recessiva potencialmente letal que afeta indivíduos de origem europeia (COLLINS, 1992). É considerada como uma doença de múltiplos órgãos, provocada por uma única anormalidade bioquímica (SFERRA; COLLINS, 1993). Essa doença é caracterizada por uma interrupção do canal de transporte de cloreto em células epiteliais, resultando em manifestações clínicas, tais como insuficiência respiratória, insuficiência pancreática e sinusite crônica (COLLINS, 1992). O movimento de cloreto através das células epiteliais é considerado um importante regulador fisiológico de sal e de água (SFERRA; COLLINS, 1993). O mecanismo celular dessa regulação envolve a membrana plasmática da superfície apical das células epiteliais. A abertura dessa membrana permite o fluxo de cloreto para dentro das células, através de um gradiente eletroquímico em resposta a estímulos β -adrenérgicos, aumentando o cAMP e ativando a proteína quinase-A, a qual provoca a abertura do canal (DRUMM; COLLINS, 1993). Na CF, a abertura do canal de cloreto é desregulada e não responde aos aumentos de cAMP (SFERRA; COLLINS, 1993).

O gene da CF está localizado no cromossomo 7 e inclui 27 éxons. A proteína codificada contendo 1480 aminoácidos é conhecida como CFTR, que funciona como um canal regulador de cloreto e de outros íons (RIORDAN et al., 1989). Na cavidade bucal, a CF tem sido associada com a elevação do pH e um aumento no teor de cálcio (MANDEL et al., 1967). Estudos sobre a CF e defeitos dentários, no entanto, apresentam algumas limitações pois os pacientes que apresentam essa doença, são tratados com diferentes medicamentos, incluindo a tetraciclina, tornando difícil o delineamento da exata etiologia do defeito dentário (WRIGHT; HALL; GRUBB, 1996; WRIGHT et al., 1996b). Uma variedade de estudos para analisar as anomalias do esmalte e as alterações associadas com a função anormal de CFTR foram realizados em modelos animais. Relatos sobre anomalias de esmalte em animais apresentando CF indicaram que células de ameloblastos do início do estágio de secreção se apresentavam com morfologia normal. No entanto, no final do estágio de secreção e início do estágio de transição da maturação, a morfologia dessas células se apresentou alterada (ARQUITT; BOYD; WRIGHT, 2002; BRONCKERS et al., 2010; SUI; BOYD; WRIGHT, 2003; WRIGHT; HALL; GRUBB, 1996; WRIGHT et al., 1996b). Faz-se importante destacar que a espessura do esmalte dos animais com CF se apresentava normal, quando visualizado através de microscopia eletrônica de transmissão (TEM) e os cristais também tinham uma morfologia semelhante aos dos animais normais, embora parecendo mais porosos. A coloração dos incisivos dos animais com CF, foi descrita como parecido ao “giz branco”, diferente da cor amarelada observada no esmalte de camundongos normais (devido à pigmentação por ferro). Essa diferença observada na coloração, pode distinguir os animais

com CF, de animais normais. Deve-se salientar que essa diferença de pigmentação no esmalte não foi notada nos molares dos animais com CF. Quando foi avaliada a composição de aminoácidos do esmalte de incisivos do estágio secretor, comparando os animais que apresentavam CF com os animais normais, ambos se mostraram bastante semelhantes, mas isso não foi observado no esmalte em maturação do esmalte, que apresentou uma diminuição do conteúdo de prolina e histidina. Em adição, o esmalte dos animais com CF se mostrou menos resistente durante a preparação mecânica. Análises da composição mineral em esmalte de animais com CF, através de espectrometria de absorção atômica, considerou que o esmalte se apresentava hipomineralizado quando comparado aos animais normais e que esses animais continham no esmalte altos níveis de magnésio (WRIGHT; HALL; GRUBB, 1996; WRIGHT et al., 1996b). Análises subsequentes do esmalte com CF indicaram diminuição dos níveis de cloreto no estágio de secreção, bem como uma redução dos íons ferro (Fe^{2+}) e potássio (K^+), em adição a uma redução nas taxas de cálcio-fósforo (ARQUITT; BOYD; WRIGHT, 2002). Com base nesses resultados, tem-se sugerido que os defeitos de esmalte de camundongos apresentando CF podem ser devidos a uma perda da capacidade dos ameloblastos para processar a matriz extracelular durante o estágio de maturação (WRIGHT; HALL; GRUBB, 1996; WRIGHT et al., 1996b). Essa capacidade anormal dos ameloblastos de processamento das AMELs (que corou positivamente no estágio de maturação do esmalte dos animais com CF, mas não em animais normais), aponta que as AMELs podem permanecer no espaço extracelular, interferindo no crescimento dos cristais, como sugerido pela topografia da superfície irregular de cristais com CF examinados usando TEM. Um estudo realizado em camundongos com CF, revelou um importante papel da CFTR na regulação do pH durante o desenvolvimento do esmalte (SUI; BOYD; WRIGHT, 2003). Esses autores demonstraram que os incisivos de animais com CFTR, coravam-se em amarelo quando imersos em solução de indicador de pH, apontando para um pH baixo ou ácido nas zonas de transição/maturação do esmalte. A relação entre a regulação do pH e a proteína CFTR vem do papel que esta proteína desempenha na regulação de Cl^- e HCO_3^- em células intestinais (ILLEK; FISCHER; MACHEN, 1998) e do suposto papel do HCO_3^- como tampão de pH no microambiente do esmalte (SMITH, 1998).

A família dos genes *Slc4* inclui proteínas de membrana que desempenham um papel importante na regulação do pH intra e extracelular e são um sistema chave de transporte de bases em células eucarióticas (PUSHKIN; KURTZ, 2006). Dois desses genes, *Slc4a2* e *Slc4a4*, codificam a **anion exchanger** (AE2) e a **sodium bicarbonate cotransporter** (NBCe1), respectivamente (PUSHKIN; KURTZ, 2006). O interesse nas proteínas AE2 e

NBCe1 foi gerado por estudos que reportaram mutações nos genes *Slc4a2* e *Slc4a4*, tendo como consequência a ocorrência de anormalidades no esmalte de humanos e de ratos (DINOURE et al., 2004; GAWENIS et al., 2004; INATOMI et al., 2004). A família do gene *Slc4*, é dividida em três grupos de acordo com sua capacidade de transporte de sódio (Na^+) e cloreto (Cl^-) simultaneamente (PUSHKIN; KURTZ, 2006). Existem três tipos distintos de proteína de membrana NBCe1 (NBCe1-A, NBCe1-B e NBCe1-C, todas codificadas a partir do locus do gene *Slc4a4*), que resultam de duas diferentes regiões promotoras da NBCe1 (NBCe1-A e -B) ou de *splicing* alternativo (NBCe1-C). Uma ampla gama de tecidos expressam NBCe1-B, enquanto que a NBCe1-A é apenas expressa nos rins e olhos (ABULADZE et al., 1998; MCALEAR et al., 2006). A variante NBCe1-C foi somente identificada em tecidos de cérebro de rato (BEVENSEE et al., 2000) e, por causa disso, parece improvável que tenha um perfil de expressão mais generalizado. No caso da AE2 (locus do gene *Slc4a2*), cinco isoformas são reconhecidas e diferem nas suas regiões promotoras (KURSCHAT et al., 2006; LECANDA; URTASUN; MEDINA, 2000; MEDINA et al., 2000). Com exceção da NBCe1-C, cada uma das isoformas da AE2 e NBCe1 podem ser identificadas pelo seu N-terminal único, enquanto que a porção C-terminal permanece constante. Tem sido mostrado que camundongos sem o gene *Slc4a2*, que codifica a AE2 são edêntulos (GAWENIS et al., 2004). Em adição, pacientes com mutação no gene *slc4a4* codificando a NBCe1 apresentam anormalidades no esmalte (DINOURE et al., 2004; GAWENIS et al., 2007; INATOMI et al., 2004). Lyaruu et al. (2008) mostraram que camundongos sem AE2a/b apresentam anormalidades no incisivo de esmalte em maturação, enquanto que, os molares são menos afetados. A perda da função da AE2, resulta em severidades no esmalte mais graves do que a perda da função da NBCe1 (DINOURE et al., 2004; GAWENIS et al., 2007; INATOMI et al., 2004). Os incisivos de camundongos sem a expressão de NBCe1 apresentam uma aparência de “giz branco” e são propensos à fratura de esmalte (GAWENIS et al., 2007; INATOMI et al., 2004). Nota-se que a mutação da NBCe1 nesses pacientes afetados envolve as três variantes dessa proteína (NBCe1A-C).

Muitos estudos experimentais realizados em células de ameloblastos trazem grande contribuição para o entendimento das mutações na codificação das proteínas e a ocorrência de distúrbios dentários associados ou não. Estudos com células de ameloblastos da linhagem LS8 mostraram que as variantes das proteínas AE2 e NBCe1 (AE2a e NBCe1-B, respectivamente), são expressas na membrana apical e basolateral de ameloblastos secretores (LACRUZ et al., 2010c; PAINE et al., 2008). Além disso os níveis da AE2a e NBCe1-B, apresentaram-se pH-dependentes, mostrando um maior nível de expressão dessas proteínas

em pHs abaixo (PAINE et al., 2008). Os resultados sugeriram que a NBCe1-B realiza o transporte de bicarbonato através da membrana basolateral dos ameloblastos, enquanto que a secreção de bicarbonato apical é mediada pela AE2a (BAWDEN, 1989; LACRUZ et al., 2010c; PAINE et al., 2008). Acredita-se que os defeitos de esmalte em pacientes com mutações do gene *Slc4a4* são devidos à função anormal dos ameloblastos (perda da função de transporte da NBCe1-B), e não à acidose sistêmica observada em acidoses metabólicas.

Para investigar o papel das NBCe1 na amelogênese, utilizaram-se diversos modelos em ratos apresentando mutações no locus gênico *Slc4a4* (designado por NBCe1^{-/-}), que não expressam nenhuma das isoformas NBCe1 (GAWENIS et al., 2007). Os resultados mostraram que esmalte de animais com ausência da NBCe1 se apresenta extremamente hipoplásico e fino, e que a sua estrutura prismática é severamente desorganizada (LACRUZ et al., 2010b). Modelos experimentais conduzidos realizados em ameloblastos descrevem o mecanismo de transporte ácido-base, sugerindo que os ameloblastos secretam bicarbonato através de sua membrana apical para tamponar a carga de prótons gerado pela formação de apatita durante o processo de amelogênese (SASAKI; TAKAGI; SUZUKI, 1991; TAKAGI et al., 1998). Diante desse aspecto, tanto a taxa de secreção de bicarbonato como a taxa de produção de prótons é dependente do estágio dos ameloblastos, dado que o pH varia de acordo com as diferentes fases da maturação (SASAKI; TAKAGI; SUZUKI, 1991; TAKAGI et al., 1998). Portanto, foi suposto que a *Slc4*, que realiza o transporte de bicarbonato, desempenha um papel importante na regulação do pH/transporte de bicarbonato em ameloblastos e outros tipos celulares (LACRUZ et al., 2010b; PAINE et al., 2008; PUSHKIN; KURTZ, 2006). Com base nos dados apresentados em relação às proteínas referidas anteriormente (CAs, CFTR, NBCe1 ou AE2), os autores propuseram um modelo de estudo para a compreensão da regulação do pH pelos ameloblastos (LACRUZ et al., 2010b).

A formação do esmalte e da dentina se inicia com uma matriz proteica extracelular que guia os eventos subsequentes de deposição de hidroxiapatita (Hap) durante o processo de formação e de biomineralização. O cálcio (Ca²⁺) e o fosfato (PO₄³⁻) são moléculas importantes para a formação de Hap, mas o seu transporte a partir da circulação sanguínea ainda se encontra em processo de compreensão. No entanto, devido à sua importância, esse movimento iônico tem sido bastante estudado (HUBBARD, 2000; SMITH, 1998). Durante a formação da dentina, o Ca²⁺ é transportado a partir da circulação vascular da polpa através da camada de odontoblastos, por uma via que se acredita ser transcelular, para que esse íon seja incorporado na fase mineral na interface entre a pré-dentina não-mineralizada e a dentina mineralizada (LINDE, 1995; TSUMURA et al., 2010). O esmalte maduro é composto por

cristais de Hap densamente organizados em prismas de esmalte (PAINE et al., 2001). Apesar do alto conteúdo mineral do esmalte, muitos estudos têm sido realizados para o correto entendimento acerca dos mecanismos de transportes de íons Ca^{2+} , HCO_3^- e Cl^- no processo de amelogênese (HUBBARD, 2000; JOSEPHSEN et al., 2010; LACRUZ et al., 2010b; LACRUZ et al., 2010c; TURNBULL et al., 2004). Um dos mecanismos utilizados pelas células para transportar Ca^{2+} , envolve os trocadores de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ [**sodium/calcium ($\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$) exchanger (NCX)** e a **sodium/calcium/potássio exchanger (NCKX)**], cuja função principal é controlar o fluxo de Ca^{2+} através de membranas plasmáticas e/ou compartimentos intracelulares (QUEDNAU; NICOLL; PHILIPSON, 2004; SCHNETKAMP, 2004). Os trocadores de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ são codificados por genes da família *Slc8a* e *Slc24a*. As proteínas NCX são transportadores bidirecionais que trocam Na^+ e Ca^{2+} promovendo tanto a entrada quanto a saída de Ca^{2+} dependendo do gradiente iônico transmembrana (UEHARA et al., 2004), enquanto que, as NCKX extruem Ca^{2+} baseado no gradiente de Na^+ , requerendo o transporte concomitante de K^+ (SCHNETKAMP; BASU; SZERENCSEI, 1989). Recentemente, a expressão da NCX1 e NCX3 foi verificada em ameloblastos (OKUMURA et al., 2010) e odontoblastos (TSUMURA et al., 2010). Em adição, um estudo subsequente apresentou evidências de expressão do RNAm para todos os seis membros da família de genes *Slc24a* no desenvolvimento de órgãos do esmalte de molares de ratos, sendo que a mais expressa foi a *Slc24a4/NCKX4* (HU et al., 2012). Outro estudo complementou esses achados e confirmou que a proteína NCKX4 em órgãos do esmalte de incisivos de ratos é altamente expressa no estágio de maturação quando comparado ao estágio de secreção (LACRUZ et al., 2012c). Diante disso, o aumento da expressão de RNAm da NCKX4 nos estágios finais da amelogênese sugere que essa proteína pode apresentas uma função importante na regulação do transporte de Ca^{2+} durante a maturação do esmalte.

Estudos têm verificado que a mudança observada tanto na estrutura como na função dos ameloblastos é possível graças a alterações na estrutura do citoesqueleto (BIZ et al., 2010; LI et al., 2011; XUE et al., 2013; ZHANG et al., 2011). Actina filamentosa (F-actina) foi localizada nos complexos juncionais dos ameloblastos e também no processo de Tomes (CHALFIE, 1995; NISHIKAWA; FUJIWARA; KITAMURA, 1988; NISHIKAWA; JOSEPHSEN, 1987). Diferentes tipos de células apresentam a ativação da via de sinalização da RhoA, associada a um aumento dos F-actina (RIDLEY; HALL, 1992). Os F-actina são detectados frequentemente em estruturas que estão associadas com o movimento celular e alterações de formas. A **RhoA** é uma das mais importantes proteínas, dentre as numerosas (mais de 20 identificadas) formas de **Rho GTPases**, desempenhando um papel importante na

formação e estruturação do citoesqueleto, bem como em outras atividades celulares (BIZ et al., 2010; LI et al., 2011; RIDLEY; HALL, 1992; VAN AELST; SYMONS, 2002; XUE et al., 2013; ZHANG et al., 2011). Essa proteína tem sido localizada em ameloblastos secretores, sendo que o tratamento com F provoca alterações no citoesqueleto intracelular de actina, mediadas pela via **ROCK** (Rho/Rho-associated protein kinase) (LI et al., 2005). A RhoA e a ROCK são importantes para a expressão da amelogenina e na diferenciação dos ameloblastos (BIZ et al., 2010). Em adição, tem sido demonstrado que o NaF aumenta a F-actina, através da ativação da via de sinalização da RhoA em fibroblastos, bem como em ameloblastos em culturas de células de dentes de ratos (LI et al., 2005). Quando a atividade da RhoA é bloqueada, na presença de inibidores (Rho kinase), tais como Y-27632, a elevação dos F-actina em dentes tratados com NaF é reduzido, o que indica um papel de RhoA na regulação do citoesqueleto em ameloblastos (LI et al., 2005). No intuito de avaliar o papel da RhoA *in vivo*, foram produzidos ratos transgênicos expressando RhoA dominante negativo (RhoA^{DN}) em ameloblastos. Os resultados mostraram que houve uma diminuição da atividade endógena da RhoA (QIU et al., 1995). Dessa forma, diversos estudos têm verificado que essa proteína apresenta grande contribuição na estruturação e formação do esmalte, e que na presença de NaF leva ao desenvolvimento de defeitos do esmalte (LI et al., 2011; PENG et al., 2011).

Incisivos de roedores são caracterizados pela sua pigmentação amarelada devido à presença de ferro (Fe²⁺), apresentando cerca de 0,030% Fe nos incisivos superiores e 0,027% nos incisivos inferiores (PINDBORG, 1953). Estudos têm mostrado que o Fe²⁺ é encontrado apenas em esmaltes mais maduros (REITH, 1961), mas sua função no esmalte ainda não é compreendida. Tem sido relatado que peixes borboleta alimentados com ração mais dura possuem mais Fe²⁺ nos dentes que aqueles com alimentados com rações mais pastosas, sugerindo-se que o Fe²⁺ pode servir como um agente para aumentar a resistência à abrasão e fraturas (MOTTA, 1987). Além disso, a concentração de Fe²⁺, está inversamente relacionada aos níveis de Ca²⁺ na borda lingual dos dentes destes peixes (SPARKS et al., 1990), consistente com as observações anteriores de que os ratos com uma dieta de alto teor de Ca²⁺ mostraram diminuição da pigmentação por Fe²⁺ em esmalte (BRUDEVOLD; SOREMARK 1967), enquanto que, os incisivos de ratos com deficiência de Fe²⁺ apresentaram maior teor de Ca²⁺ no esmalte externo (HALSE, 1973), sugerindo que o Fe²⁺ e o Ca²⁺ pode substituir um ao outro, de maneira reversível, na Hap. Tem sido também proposto que o Fe²⁺ pode diminuir a solubilidade dos cristais de hidroxiapatita (OKAZAKI; TAKAHASHI; KIMURA, 1985). Além disso, muitos camundongos *knockout* ou transgênicos levando a um silenciamento ou superexpressão, respectivamente, de produtos de genes do esmalte, apresentam esmalte

esbranquiçado e defeitos estruturais, sugerindo que a incorporação de Fe^{2+} no esmalte faz parte do seu processo normal de formação (PAINE et al., 2005; WEN; PAINE, 2013).

O ferro é essencial para todos os organismos vivos. As proteínas mais abundantes em Fe^{2+} são as **hemoproteínas**, que estão envolvidas no transporte de oxigênio. Em adição, a capacidade do Fe^{2+} em se transformar de íon férrico (Fe^{+3}) para íon ferroso (Fe^{+2}) torna-o especialmente importante em processos de transporte de elétrons e catálise enzimática. Por conta disto, a desregulação do Fe^{2+} pode causar danos celulares, devido à produção de espécies reativas de oxigênio (ANDERSON; VULPE, 2009; GKOUVATSOS; PAPANIKOLAOU; PANTOPOULOS, 2012). O excesso de Fe^{2+} que não está sendo utilizado no organismo fica estocado pela **ferritina (FTH)**, uma proteína com estrutura em forma de concha com uma cavidade central contendo Fe^{+3} . Estudos têm demonstrado elevada expressão do gene **Fth** (que codifica a FTH) em ameloblastos do estágio de maturação, quando comparados aos ameloblastos secretores (LACRUZ et al., 2011), o que foi confirmado por estudos de microscopia eletrônica, que revelaram a presença de FTH apenas em ameloblastos do estágio de maturação e na camada papilar, não sendo expressa em ameloblastos secretores (KALLENBACH, 1970; REITH, 1961; WEN; PAINE, 2013). Os relatos publicados sobre a presença de Fe^{2+} /FTH em ameloblastos de roedores são extremamente limitados (MIYAZAKI et al., 1998; REITH, 1961). A ingestão de Fe^{2+} no desenvolvimento de molares de ratos foi observado através da técnica de autorradiografia (BAWDEN; WENNBERG; HAMMARSTROM, 1978). Nesse estudo, foi demonstrado um aumento da incorporação de Fe^{2+} e da expressão da FTH nas células de órgão do esmalte de incisivos de ratos ao longo amelogênese. Dados adicionais também são apresentados para ilustrar a presença de Fe^{2+} em ameloblastos de dentes molares antes da erupção. O perfil de expressão da FTH ao longo do desenvolvimento de incisivo e molares foram avaliados por Wen (WEN; PAINE, 2013). Os autores concluíram que houve depósito de Fe^{2+} nos ameloblastos e odontoblastos avaliados, tanto nos incisivos como nos molares de ratos, levando-os a sugerir que a expressão de FTH e deposição de Fe^{2+} suportam a idéia de que o Fe^{2+} está envolvido ativamente no desenvolvimento dos dentes.

Tem sido demonstrado que durante a formação do esmalte, ameloblastos de incisivos de ratos transportam Fe^{2+} fornecido pela circulação sanguínea, para posteriormente incorporá-lo nas camadas superficiais do esmalte (MIYAZAKI et al., 1998; WEN; PAINE, 2013; YOSHIDA et al., 2012). Nesse sistema de transporte de Fe^{2+} , a FTH é utilizada como reservatório temporário de Fe^{2+} nas células. A FTH é uma proteína composta por proporções variáveis de cadeia-H (*heavy-chain*) e cadeia-L (*light-chain*) (HARRISON, 1977). Embora as

duas cadeias apresentem tamanhos semelhantes e cerca de 50% de homologia de sequência de aminoácidos, essas mostram diferenças funcionais (LEVI et al., 1994a; LEVI et al., 1994b). A FTH rica em cadeia-H apresenta baixa capacidade de armazenamento de Fe^{2+} , porém, exibe rápida cinética de liberação de Fe^{2+} . Essa isoforma é encontrada principalmente em tecidos tais como o coronário, que requer a libertação rápida de Fe^{2+} (HARRISON, 1977). Por outro lado, a FTH rica em cadeia-L apresenta elevada capacidade de armazenamento Fe^{2+} e é encontrada principalmente em tecidos do baço e tecidos hepáticos, que armazenam Fe^{2+} para ser usado por outros tipos de tecidos. No intuito de investigar a expressão de RNAm da FTH e sua localização em ameloblastos de órgãos do esmalte de ratos, autores demonstraram através de hibridização *in situ* que tanto a FTH rica em cadeia-H quanto a de cadeia-L estavam expressas (MIYAZAKI et al., 1998). Porém, a FTH rica em cadeia-H se apresentou abundantemente expressa no estágio secretor dos ameloblastos, diferindo da FTH rica em cadeia-L, mais abundante nos ameloblastos do estágio de maturação. A FTH nos ameloblastos secretores pode servir para a utilização do Fe^{2+} em reações enzimáticas dependentes desse íon e para manter ativa a secreção de proteínas nessa fase, enquanto que, a FTH nos ameloblastos no estágio de maturação pode contribuir para o armazenamento de Fe^{2+} nas células durante o transporte de Fe^{2+} a partir da circulação sanguínea e a sua deposição nas superfícies dentárias (MIYAZAKI et al., 1998).

A literatura tem estabelecido que a morfogênese e a diferenciação dos tecidos dentários são reguladas por interações epitélio-mesenquimais. Essas interações celulares são aparentemente mediadas por moléculas presentes tanto na superfície celular como na matriz extracelular (AOBA; FEJERSKOV, 2002). No entanto, tem sido mostrado que esses processos de desenvolvimento também dependem de moléculas provenientes da circulação (PARTANEN; EKBLOM; THESLEFF, 1985; PARTANEN; THESLEFF, 1987a). Proteínas como a **transferrin (TF)** têm sido descritas participando ativamente desses processos celulares. A TF é uma glicoproteína do soro, com alta afinidade de ligação ao Fe^{2+} . A afinidade da TF para o Fe^{2+} , é extremamente elevada em pHs neutros (pH 7,4) no entanto, essa afinidade diminui progressivamente em pHs ácidos (AISEN; LEIBMAN; ZWEIER, 1978). Autores têm demonstrado que a TF é necessária para a manutenção e crescimento de vários tipos de células em culturas, sendo também considerada um importante fator de crescimento para a indução da proliferação e diferenciação celular durante a embriogênese (CAM; BOUKARI; RUCH, 1989; PARTANEN; EKBLOM; THESLEFF, 1985; PARTANEN; THESLEFF, 1987a).

O papel das moléculas que circulam durante os estágios precoces da morfogênese dentária foi estudada em culturas de órgãos de germes de molares de ratos (PARTANEN; THESLEFF; EKBLÖM, 1984). Especial atenção foi dada ao efeito da TF e da insulina, que são necessárias para a indução do crescimento da maioria das células em cultura. Os resultados revelaram que a TF apresenta a capacidade de sustentar a morfogênese dentária correlacionada com uma estimulação de crescimento. Os resultados apoiam sugestões anteriores de que a TF pode ser considerada como um fator de crescimento fetal. A disponibilidade da TF em meios quimicamente definidos facilita os estudos sobre o papel de outros fatores de crescimento durante o desenvolvimento dentário. Outro achado importante desse estudo foi que, durante o desenvolvimento dos dentes *in vitro*, a exigência de TF exógena é limitada aos primeiros estágios de desenvolvimento e, somente os dentes na fase de botão e início da fase de capuz necessitam de suplementação com TF para a morfogênese, enquanto que, os dentes da fase tardia de capuz, na ausência de TF exógena em meios de culturas, não apresentam diferenças durante a morfogênese (PARTANEN; THESLEFF; EKBLÖM, 1984). Diante disso, presume-se que a principal função da TF, durante o desenvolvimento dos dentes, é a indução da proliferação e diferenciação celular baseada no transporte de Fe^{2+} nas células (CAM; BOUKARI; RUCH, 1989; PARTANEN; EKBLÖM; THESLEFF, 1985; PARTANEN; THESLEFF, 1987b, 1987a). A expressão de receptores para a TF nas células está relacionada com o seu estado de proliferação celular, diminuindo com o avançar da diferenciação, confirmando desse modo seu importante papel na organogênese embrionária (CAM; BOUKARI; RUCH, 1989; PARTANEN; EKBLÖM; THESLEFF, 1985; PARTANEN; THESLEFF, 1987a).

Estudos têm demonstrado que durante a maturação do esmalte de roedores, pigmentos de Fe^{2+} são depositados nas camadas superficiais do esmalte. Em ameloblastos, as zonas de maturação são responsáveis por essa deposição. A presença de grandes quantidades de FTH no citoplasma dos ameloblastos sugerem que o Fe^{2+} é proveniente da TF em circulação. Um ensaio *in vivo*, utilizando radioautografias de TF, foi utilizado para determinar se de fato ameloblastos do estágio de maturação possuem receptores de TF nas suas superfícies celulares (MCKEE et al., 1987). Os resultados demonstraram que ameloblastos de borda pregueada do estágio de maturação do esmalte apresentaram uma alta densidade de receptores específicos para TF em relação ao ameloblastos de borda lisa. A microscopia eletrônica e espectroscopia por energia dispersiva de raios-X confirmou a presença de FTH e Fe^{2+} , respectivamente, no interior dessas células. Postulou-se que o Fe^{2+} responsável pela pigmentação do esmalte é transportado pela TF nos ameloblastos em maturação e liga-se aos

receptores específicos de TF, encontrados principalmente em ameloblastos de borda pregueada. Relatou-se ainda que a modulação dessas células em borda lisa resultaria na perda da maior parte desses receptores (MCKEE et al., 1987).

O Fe^{2+} é um elemento essencial para muitas proteínas envolvidas em diversos processos celulares, tais como o transporte de oxigênio, a síntese de DNA, e a respiração celular. Quando não for utilizado para tais processos, o Fe^{2+} é armazenado dentro da FTH, proteína de armazenamento de Fe^{2+} para prevenir o aumento da formação de oxidantes de Fe^{2+} catalisadas pelo Fe^{2+} não-ligado. Esses oxidantes podem causar estresse oxidativo celular, o que pode afetar a função celular. Portanto, a biodisponibilidade do Fe^{2+} não-ligado nas células é mantida através de uma regulação de importação, armazenamento e exportação de Fe^{2+} . Tem sido demonstrado que em incisivos de roedores com fluorose observa-se a ausência de pigmento de Fe^{2+} no esmalte maduro (KATO et al., 1988), sugerindo a retenção de Fe^{2+} em ameloblastos e possível ocorrência de estresse oxidativo dessas células. Em adição, um estudo determinou o efeito do F no transporte e armazenamento de Fe^{2+} em ameloblastos de camundongos. Para tanto, utilizaram-se camundongos do tipo selvagem, C57BL/6, que receberam 0, 5 ou 20 mg/L de F *ad libitum* na água de beber por 9 meses. Mandíbulas foram coletadas, seccionadas, coradas com Fe^{2+} , e imunomarcadas para proteínas de transporte e armazenamento de Fe^{2+} (receptor de transferrina, ferritina e ferroportina) e enzimas antioxidantes (superóxido dismutase). A coloração com azul da Prússia revelou que os ameloblastos do estágio de maturação dos camundongos tratados com F apresentaram maior retenção de Fe^{2+} em comparação aos controles. A análise imunohistoquímica mostrou uma regulação positiva dos receptores de transferrina (importação de ferro), nenhuma mudança na ferroportina (exportação de ferro), e aumento da ferritina (armazenamento de ferro) em ameloblastos do estágio de maturação expostos ao F. Isso sugere que o Fe^{2+} intracelular é aumentado devido ao aumento do Fe^{2+} armazenado (ligado na ferritina). Curiosamente, houve também um aumento da expressão da enzima antioxidante superóxido dismutase, sugerindo uma regulação positiva específica de antioxidantes pelo F, que não está relacionada com o estresse oxidativo causado pelo aumento do Fe^{2+} não-ligado em células. Os autores concluíram que, a longo prazo, baixas doses de exposição ao F, podem proporcionar efeitos antioxidantes protetores nos ameloblastos em estágio de maturação por vias comuns de modulação (LE; NAKANO; DENBESTEN, 2013).

Durante os estágios de secreção e transição/maturação da formação do esmalte, as proteínas da matriz são degradadas pelas proteases, permitindo assim a substituição de proteínas por um biomineral estruturalmente organizado (BARTLETT; SMITH, 2013). Tem

sido demonstrado na literatura que membros de duas famílias gerais de proteases estão envolvidos no processamento e degradação das proteínas da matriz extracelular do esmalte (BARTLETT; SIMMER, 1999; BARTLETT; SMITH, 2013; CATERINA et al., 2002; CHUN et al., 2010; HU et al., 2011; IWATA et al., 2007; LU et al., 2008; NAGANO et al., 2009; YAMAKOSHI et al., 2011).

A **enamelisina** (MMP20) (~41 a 45 kDa), uma enzima da família das metaloproteases da matriz (MMP), está envolvida na degradação das principais proteínas estruturais da matriz do esmalte (AMELs, AMBN, ENAM) durante o estágio de secreção (CHUN et al., 2010; IWATA et al., 2007; NAGANO et al., 2009; RYU et al., 1999; SIMMER; HU, 2001). Essa protease é requerida para o correto desenvolvimento do esmalte, pois camundongos com mutações para MMP20 desenvolvem amelogenese imperfeita (AI) (LEE et al., 2010; PAPAGERAKIS et al., 2008). Outros estudos evidenciaram que na ausência de MMP20, as AMELs não são processadas corretamente e o esmalte desenvolve alterações na sua morfologia durante o progresso de formação (BARTLETT et al., 2011; CATERINA et al., 2002). Recentemente foi demonstrado que as MMP20 facilitam a movimentação dos ameloblastos durante o processo de formação do esmalte e que a sua inativação resultaria em displasias do esmalte (BARTLETT; SMITH, 2013). Em adição, sabendo-se que os complexos juncionais são essenciais para a formação do esmalte e necessários para a adesão célula-célula, comunicação intercelular, e na manutenção das barreiras epiteliais durante o desenvolvimento do esmalte (TERRY et al., 2010), também foi sugerido nesse estudo que, além do seu papel na degradação das proteínas da matriz do esmalte, a MMP20 também realiza a clivagem de complexos juncionais presentes nos ameloblastos, dando suporte necessário aos movimentos das células em 3D para a formação espacial de padrões complexos do esmalte bastão (BARTLETT; SMITH, 2013).

Outra enzima da família das serina proteases, conhecida atualmente como **kalikreína-4** (KLK4) (~31 a 34 kDa) é particularmente encontrada durante o estágio de transição/maturação do esmalte. Em termos gerais, em relação a estas duas principais proteases, a MMP20 é a principal protease responsável pela hidrólise inicial da AMEL durante o estágio secretor da matriz do esmalte, enquanto que, a KLK4 é responsável por degradar os produtos de degradação em fragmentos ainda menores, auxiliando a sua remoção no estágio de transição/maturação do esmalte (HU et al., 2000; HU et al., 2002; SIMMER; HU, 2002).

Nas últimas décadas, apesar de muitos estudos, os mecanismos pelos quais os ameloblastos organizam e controlam as mudanças nos cristais de hidroxiapatita do esmalte de

mamíferos têm permanecido indefinidos (LACRUZ et al., 2010b; SIMMER et al., 2010). No entanto, foi observado um aumento considerável na identificação e compreensão das diversas proteínas secretadas por essas células e os genes que as codificam (HU et al., 2007; WRIGHT et al., 2009). Em destaque, um importante avanço observado nas pesquisas, foi a identificação de enzimas secretadas pelos ameloblastos durante os principais estágios da amelogênese. Sabe-se que uma dessas enzimas age conjuntamente com a secreção das proteínas da matriz (MMP20) e a outra enzima (KLK4), mais tarde, completa a maturação do esmalte iniciada pela primeira (LU et al., 2008). Se qualquer uma dessas duas proteases é funcionalmente deficiente ou perdida, o esmalte produzido se apresenta hipomineralizado (CATERINA et al., 2002; HART et al., 2004; KIM et al., 2005; SIMMER et al., 2009). A literatura tem descrito que a MMP20 é expressa durante todo o estágio de secreção do esmalte (HU et al., 2002). No entanto, a KLK4 apresenta expressão no estágio de transição/maturação, momento em que os ameloblastos promovem o crescimento aposicional da camada de esmalte, associado ao transporte de íons e concomitante deposição de minerais (HU et al., 2002; SIMMER et al., 2009). A MMP20 é responsável desde a degradação das proteínas mais abundantes da matriz (AMELs) recém secretadas, bem como das proteínas menos abundantes (AMBN e ENAM) (CHUN et al., 2010; NAGANO et al., 2009). Estudos têm sugerido que a KLK4 promove a degradação dos fragmentos originados das AMELs, AMBN e ENAM, processadas pela MMP20 durante o estágio de secreção, facilitando assim a sua remoção a partir da camada de esmalte, assistida por atividades moduladoras de reabsorção dos ameloblastos como parte do processo de maturação (LU et al., 2008). O mecanismo pelo qual a KLK4 penetra na lâmina basal da superfície do esmalte parcialmente mineralizado e seu movimento em profundidade nas camadas de esmalte enquanto esse amadurece, ainda está indefinido. O tempo de vida e o destino a longo prazo tanto da MMP20 quanto da KLK4 nas camadas do esmalte são também pouco compreendidos.

Muitos autores têm relatado o desenvolvimento do esmalte sendo estágio-específico (LACRUZ et al., 2012a; LACRUZ et al., 2010b; LACRUZ et al., 2011; SIMMER; HU, 2001; SIMMER et al., 2010). Durante o estágio secretor, a MMP20 é expressa para degradar as proteínas da matriz do esmalte e subsequentemente proporcionar o crescimento em comprimento dos cristais (BARTLETT et al., 2011; LU et al., 2008). Em seguida, no estágio de transição/maturação do esmalte, ocorre a interrupção da expressão da MMP20, sendo substituída pela KLK4, que é ativamente expressa para auxiliar a remoção das proteínas anteriormente degradadas, permitindo assim o crescimento dos cristais em largura e espessura (BARTLETT; SIMMER, 1999; LU et al., 2008; SIMMER et al., 2009; SMITH, 1998).

Embora a expressão de MMP20 durante o estágio secretor seja essencial para a degradação das proteínas da matriz (BARTLETT; SIMMER, 1999; BARTLETT et al., 2011; BARTLETT; SMITH, 2013; CATERINA et al., 2002; LU et al., 2008; SIMMER; HU, 2001; SIMMER et al., 2012), a sua expressão também é necessária para manter a morfologia normal do órgão do esmalte durante o estágio de maturação (BARTLETT et al., 2006b). Na ausência de MMP20, nódulos de calcificação ectópica são observados na superfície do esmalte no estágio de maturação. Notavelmente, esses nódulos de formação ocorrem no esmalte de camundongos *knockout* para MMP20 (BARTLETT et al., 2011). O esmalte desses dentes se apresenta frouxamente ligado à dentina e a camada de esmalte parece se destacar da dentina, indicativo de um defeito de junção amelodentinária (JAD). O esmalte bastão e os prismas de esmalte também são alterados nos camundongos *knockout* para MMP20. Em adição, foi verificado também que os ameloblastos não migram corretamente ao se afastarem da JAD. Assim, foi demonstrado que a MMP20 é necessária para o movimento das células (ameloblastos) durante a formação do esmalte bastão, prevenindo a formação de minerais ectópicos (BARTLETT et al., 2011).

A camada de esmalte de camundongos *knockout* para a KLK4 apresenta espessura e padrão de prismas normais. Porém, essa camada é menos mineralizada, sendo constituída por proteínas residuais do esmalte e sujeitas a fraturas nas suas camadas mais profundas próximas à junção amelodentinária (JAD) (BARTLETT et al., 2011; HU et al., 2011). No entanto, a localização do plano de fratura é bastante complicada, por estar localizado nas regiões mais profundas do esmalte. Diante disso, foi realizado um estudo para caracterizar o plano de fratura de dentes em desenvolvimento, de camundongos *knockout* para MMP20 e para KLK4 (SIMMER et al., 2011a). Para isso, foram removidos os incisivos inferiores para análise em microscopia eletrônica de varredura (MEV). Os resultados demonstraram que as fraturas observadas nos camundongos *knockout* para MMP20 se localizavam na JAD. No entanto, nos camundongos *knockout* para a KLK4 as fraturas ocorreram acima do JAD. Foi também verificado nesse estudo que a KLK4 não estava expressa nos odontoblastos e ameloblastos do estágio secretor, sendo somente identificada nos ameloblastos do estágio de transição/maturação, levando os autores a concluir que a quebra do esmalte próximo da JAD em camundongos *knockout* para a KLK4 não é devida a falhas dos odontoblastos para expressar KLK4, mas refere-se a uma hipomineralização progressiva do esmalte em profundidade (SIMMER et al., 2011a; SMITH et al., 2011).

2.2 EFEITOS DO F NA AMELOGÊNESE

Após a comprovação de que comunidades com água naturalmente fluoretada apresentam redução na incidência de cárie dentária, muitos países iniciaram programas de fluoretação artificial da água de abastecimento público, nos quais aproximadamente 1 mg/L (ppm) de F é adicionado na água de consumo da população (LUDLOW; LUXTON; MATHEW, 2007). Porém, os efeitos colaterais crônicos da ingestão excessiva de F ocorrem pela administração de doses pequenas e prolongadas, atingindo principalmente os tecidos mineralizados. Quando essa exposição excessiva e crônica ocorre no período da formação dos dentes, o F pode interferir no processo de amelogênese, resultando em um esmalte hipomineralizado. Essa condição é conhecida como fluorose dentária, que em suas formas mais suaves se apresenta clinicamente como pequenas linhas brancas, ao passo que nas formas mais severas pode resultar na perda da maior parte do esmalte, provocando graves alterações na anatomia dentária (BRONCKERS; LYARUU; DENBESTEN, 2009; BUZALAF et al., 2011; BUZALAF; WHITFORD, 2011; DENBESTEN; CRENSHAW, 1984; ROBINSON et al., 2004).

Ao procurar entender por que o excesso de F provoca modificações no esmalte dentário com diferentes graus de severidade (THYLSTRUP; FEJERSKOV, 1978), muitos estudos foram sendo desenvolvidos a fim de buscar, nos mecanismos de biomineralização e em todas as suas particularidades, as respostas para o processo de desenvolvimento da fluorose dentária (BRONCKERS; LYARUU; DENBESTEN, 2009; BUZALAF; WHITFORD, 2011; DENBESTEN; CRENSHAW, 1984; WHITFORD, 1996). Acreditando que a interferência do F possa alterar não somente a biomineralização mas também a diferenciação dos ameloblastos e a modulação do processo de síntese e secreção das proteínas da matriz do esmalte, estudos realizados nessa área procuraram determinar quais mudanças ocorreriam em cada uma das etapas da formação do esmalte (DENBESTEN; CRENSHAW; WILSON, 1985; DENBESTEN; HEFFERNAN, 1989; LACRUZ et al., 2010b; SMITH; NANJI; DENBESTEN, 1993). Apesar dos atuais conhecimentos sobre os efeitos do F na amelogênese, não há consenso sobre os sítios específicos de ação do F no ameloblasto, e sobre a ação desse íon nos diferentes estágios de desenvolvimento. Os possíveis locais de ação do F e seus possíveis efeitos serão descritos a seguir.

2.2.1 Efeitos do F nos diferentes estágios da amelogênese

Para melhor compreensão sobre a etiologia da fluorose dentária é necessário analisar a complexa série de eventos que os ameloblastos sofrem durante a amelogênese. Acredita-se que os estágios de secreção e maturação do esmalte sejam os mais sensíveis ao efeito do F (BROWNE; WHELTON; O'MULLANE, 2005). Estudos experimentais realizados em culturas de ameloblastos expostos a elevadas concentrações de F demonstraram considerável influência na proliferação, diferenciação e morfologia celular dessas células, em diferentes estágios de desenvolvimento. Porém, não existem evidências, *in vivo*, comprovando o efeito do F em concentrações equivalentes à do plasma e fluido do esmalte (ANGMAR-MANSSON; WHITFORD, 1982; BRONCKERS; JANSEN; WOLTGENS, 1984b; DENBESTEN; LI, 2011).

No estágio pré-secretor, não existe evidência de que a exposição dos dentes em desenvolvimento a níveis fisiológicos de F *in vivo* (SMITH; NANJI; DENBESTEN, 1993) e em cultura de órgão do esmalte (BRONCKERS, A.L.; JANSEN; WOLTGENS, 1984b, 1984a; KERLEY; KOLLAR, 1977; LEVENSON, 1980) afeta a morfogênese dentária, uma vez que mesmo em dentes com fluorose severa, o tamanho e a forma dos dentes não são afetados (DENBESTEN; LI, 2011; KIERDORF; KIERDORF, 1997).

Quando os ameloblastos são expostos cronicamente a altos níveis de F no estágio de secreção, notam-se distúrbios morfológicos e um aumento no número de vacúolos na borda apical (DENBESTEN; LI, 2011). Nessa fase, a exposição crônica ao F através da água de beber, bem como injeções repetidas de doses moderadas de F reduzem a espessura do esmalte em cerca de 10% (SMITH; NANJI; DENBESTEN, 1993; ZHOU; ZAKI; EISENMANN, 1996), sugerindo que a exposição crônica ao F reduz a biossíntese da matriz pelos ameloblastos secretores, embora não existam evidências para suportar este achado (AOBA et al., 1990; BRONCKERS; WOLTGENS, 1985; DENBESTEN, 1986). Essa pequena redução na espessura do esmalte poderia ser devida à ruptura do transporte de vesículas nos ameloblastos secretores, bem como da degradação subsequente da matriz pelo sistema lisossomal (BRONCKERS et al., 2002; MATSUO et al., 1996; MONSOUR; HARBROW; WARSHAWSKY, 1989). A redução na espessura do esmalte no estágio secretor poderia ainda ser devido ao efeito do F no alongamento do cristal (DENBESTEN; LI, 2011).

Os ameloblastos no final do estágio de secreção e início do estágio de transição parecem ser mais sensíveis ao F que aqueles nas etapas iniciais e intermediárias de secreção (DENBESTEN; LI, 2011). Uma dose de 4,5 mg F/Kg faz com que os ameloblastos dos

germes dentários de molares de *hamsters* no final do estágio de secreção e início do estágio de transição (mas não aqueles nos estágios iniciais de secreção) destaquem-se da superfície, formando cistos subameloblásticos. O esmalte abaixo desses cistos irá originar fissuras oclusais rasas, que são frequentemente observadas em dentes com fluorose severa em várias espécies (FEJERSKOV et al., 1994; KARDOS; HUNTER; HUBBARD, 1989; KIERDORF; KIERDORF, 1997; MILHAUD et al., 1992; NELSON et al., 1989; RICHARDS et al., 1986; SUCKLING; THURLEY; NELSON, 1988; SUSHEELA; BHATNAGAR, 1993). É provável que esse estágio de desenvolvimento esteja também associado com a formação de periquemáceas acentuadas, o que corresponde ao primeiro sinal clínico da fluorose dentária (DENBESTEN; LI, 2011).

No estágio de maturação, na presença de F ocorre retenção das AMELs na matriz do esmalte de ratos (DENBESTEN, 1986; SUSHEELA; BHATNAGAR, 1993). Observa-se que os ameloblastos do estágio de maturação de incisivos de ratos são mais curtos (SMITH; NANJI; DENBESTEN, 1993), havendo também perturbações nos ciclos de modulação (DENBESTEN; CRENSHAW; WILSON, 1985; NISHIKAWA; JOSEPHSEN, 1987; SMITH; NANJI; DENBESTEN, 1993). Mediante exposição ao F, inicialmente ocorre desaparecimento dos ameloblastos de borda lisa incisais e sob exposição prolongada, outras bandas de borda lisa desaparecem uma a uma, de incisal para apical (DENBESTEN; CRENSHAW; WILSON, 1985). O F ainda reduz a incorporação cíclica de Ca^{+2} (KERLEY; KOLLAR, 1977) num padrão similar (DENBESTEN; CRENSHAW; WILSON, 1985). Esses efeitos são reversíveis. Quando a exposição ao F é descontinuada, as bandas de borda lisa reaparecem, iniciando da porção apical (mais jovem) para a incisal (mais velha), sugerindo que as células em modulação mais jovens se recuperam mais prontamente que aquelas mais velhas (DENBESTEN; LI, 2011).

2.2.2 Efeitos diretos do F nos ameloblastos

As mudanças observadas na estrutura do esmalte têm sido associadas às injúrias que acometem a sua principal célula formadora, os ameloblastos (BRONCKERS; LYARUU; DENBESTEN, 2009; DENBESTEN; LI, 2011). A desorganização do processo de maturação induzida por alterações citológicas nos ameloblastos, como resultado da interação de fatores externos, como a exposição ao F, tem sido bastante estudada na literatura (AOBA; FEJERSKOV, 2002; BRONCKERS; LYARUU; DENBESTEN, 2009; DENBESTEN; LI, 2011; LI et al., 2011).

Ameloblastos e órgãos do esmalte expostos a níveis milimolares de F, *in vitro*, mostram alterações na sua estrutura, redução da síntese e secreção de proteínas, alteração na proliferação celular, indução da apoptose, estresse celular, alteração dos filamentos de actina do citoesqueleto, dentre outras (BRONCKERS; LYARUU; DENBESTEN, 2009; DENBESTEN; LI, 2011; DENBESTEN et al., 2002; KUBOTA et al., 2005; LI et al., 2005; ROBINSON et al., 2004; SHARMA; TSUCHIYA; BARTLETT, 2008; SHARMA et al., 2010; SMITH; NINCI; DENBESTEN, 1993). No entanto, algumas dessas alterações não são evidentes *in vivo*, e, portanto, os efeitos do F quando examinados em cultura devem ser cuidadosamente analisados em termos de relevância biológica (DENBESTEN; LI, 2011).

Nas últimas décadas, diversos estudos vêm confirmando o efeito tóxico do F nas células do órgão do esmalte. Li e colaboradores (2005) avaliaram o efeito do F sobre os F-actina, utilizando, para isso, órgãos do esmalte em cultura e análise de microscopia confocal. Foi verificado que a concentração de 2 mmol/L de F afetou a via de sinalização **Rho/ROCK** resultando no aumento dos F-actina em ameloblastos. Acredita-se que o F altere as modulações cíclicas dos ameloblastos, promovendo alterações funcionais e morfológicas nessas células. Níveis milimolares de F também foram utilizados por Kubota et al. (2005). Nesse estudo, ameloblastos derivados do órgão do esmalte de ratos foram expostos a concentrações de 0 a 2 mmol/L de F. A partir de 1,5 mmol/L de F, observou-se a indução da apoptose, estresse do RE, redução da proliferação celular e fragmentação de DNA dos ameloblastos mediada pela *caspase*. Posteriormente, outros estudos avaliando o efeito de 1 mmol/L de F no RE de ameloblastos obtidos do órgão do esmalte observaram similar resposta de estresse do RE nessas células (SHARMA; TSUCHIYA; BARTLETT, 2008; WEI et al., 2013).

Diversas pesquisas têm verificado graves alterações estruturais nos ameloblastos expostos ao F. Estudos em roedores mostraram que a ingestão de F altera o número de bandas de ameloblastos de borda lisa e a taxa de modulação nos ameloblastos do estágio de maturação (BRONCKERS; JANSEN; WOLTGENS, 1984b; NISHIKAWA; JOSEPHSEN, 1987). No entanto, não existe atualmente nenhuma evidência para determinar se essas alterações na modulação dos ameloblastos do estágio de maturação são consideradas uma consequência direta do F ou, mais provavelmente, uma resposta às alterações relacionadas com a exposição ao F durante a formação da matriz do esmalte (DENBESTEN; LI, 2011).

O efeito da administração parenteral de uma única dose de F induz a formação de uma resposta dupla nos ameloblastos do estágio de secreção. A desorganização estrutural dos ameloblastos é caracterizada pela formação de uma camada de esmalte hipermineralizada,

seguida por uma camada hipomineralizada localizada na subsuperfície do esmalte (LYARUU et al., 1989). Tem sido relatado que esses distúrbios de desenvolvimento são ocasionados por alterações temporárias na estrutura dos ameloblastos do estágio de secreção (FEJERSKOV et al., 1979; WALTON; EISENMANN, 1974; WEBER; YAEGER, 1964). Estudos prévios realizados em molares de *hamsters* neonatais mostraram que o F não afeta igualmente os diversos tipos de ameloblastos. Dados preliminares sugeriram que os ameloblastos do estágio de transição são mais sensíveis ao F (LYARUU et al., 1989; LYARUU et al., 1990).

Desvendar o(s) mecanismo(s) molecular(es) envolvido(s) nas alterações estruturais dos ameloblastos expostos ao F tem sido foco de muitos estudos. Autores avaliaram a hipótese de que a sensibilidade ao F depende do estágio de desenvolvimento dos ameloblastos (LYARUU; BERVOETS; BRONCKERS, 2006). Geralmente, os distúrbios de mineralização observados na superfície do esmalte fluorótico são causados por danos nos ameloblastos do final do estágio de secreção e de transição/maturação. Para tanto, foram utilizados *hamsters* neonatais, expostos a uma única dose intraperitoneal de 2,5-20 mg F/kg de peso corporal. Na dose ≥ 5 mg F/kg, não houve alteração na estrutura dos ameloblastos. No entanto, a administração de 10 mg F/kg, induziu a formação de lesões císticas nos ameloblastos do final do estágio de secreção e de transição/maturação. Na dose de 20 mg F/kg, houve a formação de lesões císticas contendo células necróticas no início do estágio de secreção da amelogênese. Os autores concluíram que a sensibilidade dos ameloblastos ao F é dependente do estágio de desenvolvimento. Ameloblastos do estágio de transição/maturação são mais sensíveis ao F, seguidos por aqueles em estágios iniciais de secreção. Esses dados sugerem que um aumento da concentração de F, induz à morte celular nos ameloblastos do estágio de transição/maturação, acompanhado da formação de uma lesão cística, o que poderia explicar a formação das fissuras oclusais observadas clinicamente nos esmaltes fluoróticos em erupção (LYARUU; BERVOETS; BRONCKERS, 2006).

A formação das fissuras oclusais observadas no esmalte fluorótico não está totalmente elucidada. Tem sido sugerido que as fissuras são formadas pré-eruptivamente, devido a uma disfunção temporária nos ameloblastos do final do estágio de secreção (KIERDORF; KIERDORF, 1997). Outros autores, entretanto, defendem a hipótese de que as fissuras são formadas pós-eruptivamente, ou seja, devido à porosidade (hipomineralização) das camadas do esmalte, essas se quebram quando o dente entra em erupção e função na cavidade bucal (ISHII; SUCKLING, 1986). Diversos estudos em animais evidenciaram que o F quando administrado por via parenteral, induz a formação de lesões císticas, mais conhecidas como cistos subameloblásticos (LYARUU et al., 1989; MORNSTAD; HAMMARSTROM, 1978;

NORDLUND; EKSTRAND; HAMMARSTROM, 1986). A formação dessas lesões em roedores ocorre principalmente no desenvolvimento de germes de dentes molares, e muito raramente nos incisivos (NORDLUND; EKSTRAND; HAMMARSTROM, 1986; NORDLUND; LINDSKOG, 1986), estando na dependência do efeito dose-tempo-dependente (LYARUU; BERVOETS; BRONCKERS, 2006). As consequências da formação dos cistos subameloblásticos na mineralização do esmalte continua sendo investigada até os dias atuais. Nesse sentido, tem sido suposto que os cistos subameloblásticos formados no final do estágio de secreção e transição/maturação, após administração de uma dose de F dão origem às fissuras e manchas brancas clinicamente visualizadas no esmalte fluorótico.

Recentemente, foi avaliado o destino dos cistos subameloblásticos, seguindo o seu desenvolvimento do início ao fim da erupção dentária (LYARUU et al., 2011). Para isso, foi administradas uma única dose de 20 mg F/kg de peso corporal, em *hamsters* neonatais. Os dados mostraram que os cistos subameloblásticos formados após a exposição ao F, podem dar origem às áreas brancas e opacas clinicamente visíveis na fluorose. A localização aproximada dessas áreas brancas (1/3 a 1/2 da ponta da cúspide) são próximas da posição e do número de cistos subameloblásticos, visualizados nos estágios pré-eruptivo (secreção e transição/maturação). No entanto, os autores não descartam a hipótese de que as fissuras encontradas nos esmalte fluoróticos podem ser formadas pós-eruptivamente pela perda da camada porosa encontrada nas lesões de manchas brancas de fluorose (FEJERSKOV; THYLSTRUP; LARSEN, 1977). Notavelmente, uma certa recuperação da lesão pode ocorrer pré-eruptivamente se o F for removido (houve desaparecimento dos cistos subameloblásticos após três dias da injeção), pela migração coronária de novos ameloblastos para o espaço livre (abaixo do cisto) deixado pelos ameloblastos que se destacaram (LYARUU et al., 2011). Subsequentemente, foi conduzido um estudo com metodologia similar, para determinar qual estágio é mais afetado pela exposição aguda ao F. Utilizando modelos de molares de *hamsters*, os resultados mostraram que os defeitos de esmalte se localizavam acima da metade da cúspide dos molares, locais onde os cistos tinham se formado no final do estágio de secreção e de transição/maturação (LYARUU et al., 2012).

As concentrações biologicamente relevantes de F são baseadas nas concentrações plasmáticas e do fluido do esmalte na presença da fluorose (AOBA; MORENO, 1987). Estudos em roedores mostraram que a concentração de 5 $\mu\text{mol/l}$ de F resultou em hipomineralização do esmalte (ANGMAR-MANSSON; WHITFORD, 1982, 1984). Posteriormente, a fluorose foi induzida em esmalte de suínos expostos às concentrações de 5-12 $\mu\text{mol/l}$ de F (RICHARDS; KRAGSTRUP; NIELSEN-KUDSK, 1985). Importantes

avanços têm sido realizados em experimentos de culturas de ameloblastos no intuito de simular as concentrações de F encontradas no plasma e fluido do esmalte, *in vivo*, durante a fluorose dentária. Nesse sentido, estudos atuais têm confirmado que os ameloblastos são sensíveis a níveis micromolares de F em culturas de células (YAN et al., 2007; ZHANG et al., 2007; ZHANG et al., 2006). Um estudo reportando esse efeito, testou a hipótese de que concentrações micromolares de F poderiam alterar diretamente a função dos ameloblastos por perturbar o equilíbrio da expressão de proteínas e proteases da matriz do esmalte. Para isso, células removidas do órgão do esmalte foram expostas até uma concentração de 10 $\mu\text{mol/l}$ de F. A escolha dessa concentração pelos autores foi no intuito de aproximar às concentrações plasmáticas de F encontradas na fluorose (5-10 $\mu\text{mol/l}$ de F). Os resultados mostraram que houve redução da expressão de MMP20 na concentração de 10 $\mu\text{mol/l}$ de F quando comparado às células não tratadas. No entanto, não foi observado efeito tóxico do F na produção de AMELs e KLK4, indicando que concentrações micromolares apresentam efeito tóxico específico na expressão da MMP20 (ZHANG et al., 2006). Posteriormente, o mesmo grupo de pesquisa realizou um estudo para avaliar o efeito tóxico do F na expressão da MMP20, durante a via de sinalização mediada pela **JNK/c-Jun**. Ameloblastos foram expostos a 10 $\mu\text{mol/l}$ de F, e os resultados confirmaram uma redução da expressão da MMP20 e que a via de sinalização JNK/c-Jun é peça chave na regulação da expressão dessa protease nos ameloblastos (ZHANG et al., 2007). Posteriormente, um subsequente estudo *in vitro*, realizado em células epiteliais do órgão do esmalte, crescidas em meio de cultura contendo F, evidenciou um aumento significativo dos índices apoptóticos. Em relação à proliferação celular, os autores relataram um efeito bifásico nos ameloblastos, isto é, quando expostos a baixas concentrações de F (16 $\mu\text{mol F/L}$) houve proliferação celular aumentada. No entanto, na presença de alta concentração de F (>1 mmol F/L) foi observada uma inibição da proliferação celular (YAN et al., 2007).

O desenvolvimento dos tecidos mineralizados é resultante de um complexo processo temporo-espacial de expressão, adesão de moléculas, crescimento e fatores de transcrição descritos nos estágios iniciais de formação, e que se perpetuam durante a diferenciação celular dos ameloblastos e formação do esmalte (JERNVALL; THESLEFF, 2000). Diferentes tecidos mineralizados compartilham vias de sinalização comuns. Diante desse aspecto, tem sido demonstrado que anormalidades no sistema **OPG/RANK/RANKL** levam a disfunções em vários tecidos. A expressão de genes durante a diferenciação celular foi avaliada na presença do F por Sasaki (2003). O autor ao avaliar o efeito da OPG na diferenciação e

função dos osteoclastos, observou que a adição de OPG inibiu a formação de bordas rugosas nos osteoclastos maduros, reduziu a expressão de H^+ -ATPase de membrana, reduziu sua função reabsorptiva e induziu a apoptose de alguns osteoclastos. Apesar das diferenças funcionais e morfológicas entre os ameloblastos e os osteoclastos, há uma tendência em se fazer analogias entre as suas bordas pregueadas devido às similaridades morfológicas e de algumas enzimas entre as bordas pregueadas dessas células (AL KAWAS et al., 1996; JOSEPHSEN; FEJERSKOV, 1977; LIN et al., 1994) e à forte suposição de que a borda pregueada dos ameloblastos reabsorve proteínas da matriz simultaneamente à maturação do esmalte (ABIKO et al., 2001; INAGE; TODA, 1996; SALAMA et al., 1990; SALAMA; ZAKI; EISENMANN, 1991). Posteriormente, foi avaliada a expressão dos genes para OPG, RANK e RANKL durante a odontogênese de camundongos, desde o espessamento epitelial até os estágios de cito-diferenciação (OHAZAMA; COURTNEY; SHARPE, 2004). A expressão de OPG e RANK foi observada em ambos os epitélios externo e interno do órgão do esmalte, bem como na papila dentária mesenquimal. A adição de OPG exógena a culturas de primórdios dentários atrasou o desenvolvimento dentário, resultando no atraso da mineralização. Devido a esse padrão de distribuição, os autores propuseram que a expressão espaço-temporal dessas moléculas nos primórdios do desenvolvimento dentário apresenta um papel importante na coordenação do desenvolvimento dos dentes.

Para um melhor entendimento sobre o efeito do F e a significativa redução do número de ameloblastos devido à apoptose (morte celular programada), várias cascatas de sinalização têm sido estudadas (NISHIKAWA; SASAKI, 1995; SMITH; WARSHAWSKY, 1977). Importantes cascatas de sinalização, incluindo a expressão de **BMPs**, **Wnts**, **Fgfs** e **Shh**, contribuem para o desenvolvimento dentário dos mamíferos e estão localizadas em sítios de interação celular epitélio-mesenquimal (THESLEFF; NIEMINEN, 1996). Os sinais gerados pelas cascatas de sinalização envolvendo Wnts, BMPs e TGF- β também têm sido associados aos eventos apoptóticos (THESLEFF, 2003). O mecanismo pelo qual a apoptose normal dos ameloblastos é controlada ainda não está totalmente esclarecido. Entretanto, estudos verificaram que uma fina regulação das vias de sinalização é requerida para a diferenciação celular e controle apoptótico dos ameloblastos. Níveis anormais de BMPs e Wnts, sejam eles elevados ou reduzidos, podem resultar em apoptose, devido às alterações durante as respectivas vias de sinalização (PAYNE-FERREIRA; YELICK, 2003; SOLLOWAY; ROBERTSON, 1999; WALL; HOGAN, 1995). A **Alk-8** (quinase activina tipo receptor) é um receptor de TGF- β tipo II presente no peixe-zebra, análoga ao humano **Alk2**, sinalizada pela via da BMP (PAYNE; POSTLETHWAIT; YELICK, 2001) e está envolvida no

desenvolvimento dentário (PAYNE; SKOBE; YELICK, 2001; PERRINO; YELICK, 2004). Em um estudo realizado por Barlett et al. (BARTLETT et al., 2005) foi demonstrado que, sob exposição ao F, os germes dentários em desenvolvimento no peixe-zebra exibiam um nível reduzido de Alk8 quando comparados aos germes dentários não tratados. A perda da expressão de Alk8 estava limitada às células ameloblasto-*like* do epitélio interno do órgão do esmalte circundando o germe dentário em sino, enquanto que a Alk8 estava expressa normalmente no epitélio da cripta circunjacente, bem como em outros tecidos não dentários. Quando dramaticamente sub-regulada, a Alk8 resulta numa redução da atividade da bmp2b-4 e aumento da apoptose nos elementos da cartilagem em desenvolvimento (PAYNE-FERREIRA; YELICK, 2003). Bartlett et al. (2005) também relataram que o tratamento de peixes-zebra com F resulta em aumento da apoptose dos ameloblastos. Esta apoptose aumentada deve refletir um gradiente perturbado de sinalização via BMP e vias inadequadas de crescimento, culminando com a morte celular programada. Uma vez que defeitos na adesão celular também podem resultar em apoptose, os autores também analisaram a molécula de adesão **E-cadherin**, mas nenhuma alteração na expressão foi detectada nos germes dentários tratados com F. A via de sinalização da Wnt também tem sido relatada influenciar na apoptose, mas dois componentes desta via, β -catenina e APC não tiveram expressão alterada na presença do F.

O envolvimento da expressão de proteínas e reguladores da diferenciação e proliferação celular, tem sido bastante citado na literatura desempenhando importantes funções no processo de apoptose dos ameloblastos, induzida pelo excesso de F (YANG et al., 2013). A **Bcl-2**, uma importante proteína anti-apoptótica, inibe a apoptose controlando a permeabilidade da membrana mitocondrial externa. A Bcl-2 desempenha um papel central na inibição da apoptose durante o desenvolvimento embrionário, incluindo amelogênese (HARDWICK; CHEN; JONAS, 2012; MARTINOU; YOLE, 2011). O ácido retinóico (RA) é um importante regulador da proliferação e diferenciação celular em diversos tecidos, tais como os odontoblastos (KOUSSOULAKOU; MARGARITIS; KOUSSOULAKOS, 2011; ROGERS, 1996). A dexametasona (DEX) pode melhorar a diferenciação dos osteoblastos e estimular a diferenciação de células da polpa em odontoblastos-*like* (ALLIOT-LICHT et al., 2005; CHEN, 2004). Sabe-se que o efeito do F varia em diferentes tipos de ameloblastos. Ameloblastos do estágio de maturação são mais susceptíveis aos efeitos da exposição crônica ao F que os ameloblastos de transição e início de secreção, que são sensíveis a curto prazo (DENBESTEN; THARIANI, 1992; LYARUU; BERVOETS; BRONCKERS, 2006).

O mecanismo pelo qual o F atinge os ameloblastos seletivamente em estágios

específicos não é bem compreendido. Diante disso, Yang et al. (2013) utilizaram células ameloblasto-*like* (LS8) induzindo sua maturação com ácido retinóico (RA) e dexametasona (DEX). Para determinar o mecanismo molecular da apoptose de ameloblastos induzida pelo excesso de F, foi avaliada a expressão de Bcl-2 e a apoptose/morte celular de ameloblastos do estágio de maturação. Neste estudo, foi estabelecido um modelo de trabalho usando RA/DEX para induzir ameloblasto-*like* (LS8) ao estágio de transição/maturação *in vitro*. Além disso, foi demonstrado que doses elevadas de F, apresentam efeitos tóxicos em ameloblastos do estágio de maturação, resultando em apoptose e morte celular mediada pela baixa expressão de Bcl-2. A baixa expressão de Bcl-2 resultou em proteção reduzida contra a morte celular, levando os autores a concluir que a exposição excessiva ao F resulta na morte celular dos ameloblastos do estágio de maturação, embora o mecanismo exato ainda não esteja esclarecido (YANG et al., 2013).

2.2.3 Efeitos do F na matriz do esmalte em formação

A ingestão excessiva de F durante a formação dos dentes resulta em alterações na estrutura e composição do esmalte, condição conhecida como fluorose dentária (AOBA; FEJERSKOV, 2002; BRONCKERS; LYARUU; DENBESTEN, 2009; BUZALAF; WHITFORD, 2011; DENBESTEN; LI, 2011). A fluorose no esmalte apresenta diminuição do conteúdo inorgânico e aumento do conteúdo orgânico, tanto em dentes humanos (BHUSSRY, 1959), como em dentes de ratos (SHINODA, 1975). A interferência do F, não somente na mineralização, bem como na diferenciação dos ameloblastos e na modulação do processo de síntese e secreção das proteínas da matriz do esmalte tem sido alvo de diversos estudos realizados com o propósito de determinar quais mudanças ocorreriam em cada uma das etapas da amelogênese (BRONCKERS; LYARUU; DENBESTEN, 2009; BUZALAF; WHITFORD, 2011; DENBESTEN; LI, 2011; DENBESTEN et al., 2002).

A citotoxicidade do F nas células do epitélio interno do órgão do esmalte, foi estudada em culturas de células de molares de *hamsters* com três à quatro dias de idade, períodos correspondentes ao final da secreção da matriz (BRONCKERS; JANSEN; WOLTGENS, 1984b). Para isso, os germes foram expostos, por oito dias, às concentrações que variaram de 2,6 µmol/l (=0,05 mg/L de F) a 1,31 mmol/l (=25 mg/L de F). Os resultados mostraram que na concentração de 1,31 mmol/l (=25 mg/L de F) não houve produção de esmalte e os ameloblastos se apresentavam desorganizados e morfológicamente alterados. Nas culturas de células com 52 µmol/l (=1 mg/L de F) a matriz formada se apresentava amorfa e na

concentração de 26 $\mu\text{mol/l}$ ($=0,5 \text{ mg/L}$ de F) foi identificada a presença de uma matriz dentro dos padrões de normalidade. Evidenciou-se que abaixo de 10,52 $\mu\text{mol/l}$ ($=0,2 \text{ mg/L}$ de F), o padrão morfológico da matriz produzida foi igual ao do grupo controle, levando os autores a concluir que a concentração mínima de F que pode afetar a formação do esmalte de *hamsters* em culturas é de 1,31 mmol/l , equivalente a 25 mg/L de F (BRONCKERS; JANSEN; WOLTGENS, 1984b).

A diminuição da quantidade de proteínas secretadas em esmalte com fluorose tem sido estudada. Ao ser comparada quantitativamente a matriz do estágio de secreção do esmalte, nos dentes com e sem fluorose, não se observaram diferenças entre os grupos quanto à quantidade de proteínas secretadas (DENBESTEN; CRENSHAW, 1984). O efeito da ingestão crônica de elevados níveis de F durante a maturação do esmalte também foi testada nesse mesmo experimento. Para tanto, ratos ingeriram por 5 semanas na água de consumo, concentrações de 75, 100 e 150 mg/L de F. Após o período de tratamento, foram comparados os grupos com base nos componentes proteicos e na presença de F. Os resultados indicaram que a partir da concentração de 75 mg/L de F foi observado um aumento na concentração de F e retenção das proteínas da matriz, levando-os a sugerir uma provável interferência no desenvolvimento pós-secretor e pré-eruptivo do esmalte dos espécimes estudados. Posteriormente, utilizando metodologia similar, foi demonstrado que no início do estágio de maturação, a ingestão crônica de 75 mg/L de F era suficiente para quebrar a modulação dos ameloblastos, fator esse que poderia contribuir também para a retenção das proteínas, principalmente as AMELs (DENBESTEN; CRENSHAW; WILSON, 1985).

Utilizando como ferramenta a cromatografia e a eletroforese em espécimes de ratos submetidos a concentrações de 10, 25, 50 e 100 mg/L de F, foi avaliado o efeito do F nos estágios de secreção e início e final do estágio de maturação do esmalte. Com a eletroforese os resultados mostraram que, em todas as isoformas estudadas, observou-se um atraso na degradação enzimática durante o estágio de maturação do esmalte, mesmo tendo sido quase todas removidas ao final desse período. Os autores atribuíram ao F um efeito direto na atividade enzimática e, conseqüentemente, no atraso da remoção das proteínas do esmalte (DENBESTEN, 1986).

Autores estudaram a interação das AMELs com a superfície dos cristais de hidroxiapatita utilizando, para isso, germes de incisivos de suínos (TANABE et al., 1988). Os resultados mostraram que a substituição da hidroxila por F nos cristais de hidroxiapatita pode elevar a adsorção das proteínas do esmalte por aumentar, no meio, o número de moléculas com capacidade de adsorção, o que pode ser explicado pela alta estabilidade da superfície de

fluoroapatita, implicando em uma menor liberação de energia e na interação mais frágil entre a superfície e as moléculas de água. De acordo com os autores, como a fluoroapatita desloca mais água que a hidroxiapatita, as moléculas hidrofílicas de AMELs teriam sua interação com essa superfície aumentada. Esses eventos poderiam afetar a degradação enzimática das AMELs devido à atividade catalítica da superfície do esmalte em formação ou pela modulação da conformação do substrato em questão (TANABE et al., 1988).

Ainda em relação às interações bioquímicas observadas na estrutura do esmalte, buscou-se determinar a possível capacidade de ligação do F às proteínas da matriz (DENBESTEN et al., 1992). Para tanto, foram utilizados ratos que ingeriram água contendo 0 e 100 mg/L de F, por 6 semanas. Após o tratamento, foi constatada a existência de ligação iônica entre o F e as proteínas das matrizes em processo de mineralização. Observou-se também a presença de uma interação entre o Ca^{+2} e o F no estágio de secreção, sugerindo que o composto formado poderia afetar a remoção das proteínas e, conseqüentemente, o processo de maturação do esmalte (DENBESTEN et al., 1992).

A MMP20 e a KLK4 são enzimas proteolíticas que participam ativamente na degradação das proteínas do esmalte durante o processo de amelogênese (BARTLETT; SIMMER, 1999; BARTLETT et al., 2011; BARTLETT; SMITH, 2013; DENBESTEN; HEFFERNAN, 1989; DENBESTEN et al., 2002; SIMMER; HU, 2001; SIMMER et al., 2011a; SMITH, 1998; SMITH et al., 2011). Permeando a fase fluida do esmalte, atuam na matriz extracelular clivando a extremidade carboxílica terminal de algumas proteínas recém secretadas, como por exemplo, as AMELs, AMBN, ENAM, alterando sua massa molecular. A mais importante função desempenhada pelas enzimas proteolíticas do esmalte está relacionada com a degradação e remoção das proteínas da matriz, permitindo a disponibilidade de áreas livres para o crescimento dos cristais de hidroxiapatitas (AOBA, 1997; FINCHAM; MORADIAN-OLDAK; SIMMER, 1999).

A formação do esmalte tem início com a secreção de proteínas da matriz durante o estágio secretor da amelogênese (LACRUZ et al., 2010b). Em conjunto, essas proteínas formam uma matriz que organiza os cristais de hidroxiapatite do esmalte. Uma vez que os cristais atingem o seu comprimento final, os ameloblastos secretam enzimas proteolíticas, para degradar as proteínas da matriz, permitindo o crescimento em largura e espessura dos cristais (SIMMER; HU, 2001). Nesse momento, as proteínas são então degradadas e reabsorvidas, deixando para trás o esmalte completamente maduro, apresentando um conteúdo mineral superior a 96%. O esmalte com fluorose, no entanto, apresenta baixo conteúdo mineral e elevado conteúdo protéico (DEN BESTEN, 1986; DENBESTEN;

HEFFERNAN, 1989; SHINODA, 1975; SHINODA; OGURA, 1978; TRILLER, 1979; WRIGHT et al., 1996a; ZHOU; ZAKI; EISENMANN, 1996) e, portanto, reduzida dureza. Estudos têm sugerido que o F apresenta efeito direto sobre a atividade das enzimas proteolíticas do esmalte, provocando a retenção das proteínas da matriz do esmalte (AOBA; FEJERSKOV, 2002; BAWDEN et al., 1995; DENBESTEN; HEFFERNAN, 1989; ROBINSON et al., 2004; ROBINSON; KIRKHAM, 1990; WRIGHT et al., 1996a). No entanto, o mecanismo de ação do F que leva à redução da atividade das enzimas proteolíticas ainda permanece incerto.

Explicar o atraso da degradação da matriz do esmalte tem sido um dos aspectos mais estudados em relação à patogênese da fluorose dentária. Uma das respostas para esse processo está na possível ação direta do F na atividade das enzimas proteolíticas, destinadas a degradar as proteínas do esmalte (DENBESTEN, 1986). No entanto, foi comprovado através de um estudo que utilizou como ferramenta a colorimetria e zimografia de matriz do esmalte extraída de ratos, não haver efeito do F sobre as proteases (GERLACH et al., 2000). Os resultados desse estudo permitiram a exclusão dessa hipótese para explicar o desenvolvimento da fluorose dentária, sendo considerada mais viável a hipótese das prováveis trocas energéticas ocorridas na superfície dos cristais frente ao F. De qualquer modo, as teorias relacionadas ao comportamento da matriz protéica do esmalte frente ao excesso de F voltam-se à permanência das AMELs nessa matriz, que se torna deficiente em mineralização e produz um esmalte estruturalmente alterado.

Foi conduzido um estudo para avaliar os efeitos da ingestão de F na atividade da MMP20, nos estágios de secreção e maturação (DENBESTEN et al., 2002). A atividade das proteases foi mensurada por ensaio de fluorescência em esmalte de ratos que receberam 0, 50 e 100 mg/L de F na água de consumo. Os resultados mostraram que no estágio de secreção não houve redução da atividade proteolítica. No entanto, no final do estágio de maturação, foi observada uma diminuição significativa da atividade das proteases por unidade de proteína nos ratos que receberam F em ambas concentrações analisadas (50-100 mg/L de F). A hidrólise de AMEL foi também avaliada através do uso de uma protease recombinante (rMMP20) na presença de 0, 2, 5, 10 e 100 μ M de F, em gel de poliacrilamida. Os resultados confirmaram a capacidade do F reduzir a hidrólise da AMEL na concentração de 100 μ M de F, em pH neutro. Entretanto, na concentração igual ou abaixo de 2 μ M de F, houve redução significativa da atividade apenas no pH 6,0, não sendo observada redução da atividade em pH 7,2. Os autores aventaram a possibilidade das proteases necessitarem de pH neutro (7,2) e

níveis de F mais elevados para promover a redução da atividade proteolítica (SMITH et al., 1996), levando-os a concluir que na presença de concentrações micromolares de F, a atividade das proteases podem ser reduzidas somente quando o pH estiver abaixo de 6,0 (DENBESTEN et al., 2002).

Posteriormente, o mesmo grupo de pesquisa investigou o papel do F na síntese e secreção da principal protease (MMP20) responsável pela hidrólise inicial das AMLs, no estágio de secreção do esmalte (ZHANG et al., 2006). Para isso, ameloblastos de dentes humanos foram expostos a 10 $\mu\text{mol/l}$ de F e analisados quanto à expressão de MMP20. Os autores optaram por essa concentração, para poder alcançar similaridades com as concentrações plasmáticas, em humanos que ingerem 5-10 $\mu\text{mol/l}$ de F na água de beber. Os resultados mostraram que na concentração de 10 $\mu\text{mol/l}$ de F houve diminuição da expressão de MMP20, em comparação ao controle, sugerindo-se que o F pode alterar a expressão de MMP20 pelos ameloblastos, resultando em uma perturbação do equilíbrio entre a MMP20 e o seu substrato, contribuindo para a retenção de AMELs observada no esmalte com fluorose (ZHANG et al., 2006).

A *unfolded protein response* (UPR) é uma via de sinalização responsável por aliviar o estresse do retículo endoplasmático (RE) ou induzir a apoptose das células estressadas. A fosfatase alcalina (FA), na sua forma secretada, é utilizada para detectar e quantificar o estresse do RE (BERGER et al., 1988; HIRAMATSU et al., 2006). Estudos prévios mostraram que o F induz estresse no RE em ameloblastos, comprometendo a sua função durante a formação do esmalte (KUBOTA et al., 2005). Diante disso, foi realizado um estudo para determinar os efeitos de baixas concentrações de F (2,4 mg/L de F) na indução do estresse do RE em ameloblastos da linhagem LS8, o que resultaria na inibição da secreção de proteínas (SHARMA; TSUCHIYA; BARTLETT, 2008). Os autores observaram que o F inicia uma resposta de estresse no RE em ameloblastos, diminui a síntese e secreção extracelular da FA (apresentando um efeito dose-dependente), aumenta o acúmulo intracelular de FA e provoca a ativação da via de sinalização UPR. Portanto, os autores concluíram que o F inicia uma resposta de estresse no RE de ameloblastos, interferindo na síntese e secreção de proteínas e na função dos ameloblastos durante o desenvolvimento do esmalte, culminando na fluorose dentária (SHARMA; TSUCHIYA; BARTLETT, 2008).

Os estudos que investigam os efeitos do F nos ameloblastos e o mecanismo de ação do F envolvidos na fluorose, são geralmente baseados em estudos *in vitro*, tanto em culturas de células quanto em modelos experimentais em animais. A utilização desses modelos

experimentais requer uma dose de F biologicamente relevante, e por isso, os estudos devem ser cuidadosamente interpretados quando se pretende fazer extrapolações para a situação clínica. De acordo com uma revisão de literatura publicada em 2009, o impacto do F nos ameloblastos e o seu mecanismo de ação no desenvolvimento da fluorose, parecem ser dependentes de inúmeros fatores (BRONCKERS; LYARUU; DENBESTEN, 2009). Segundo os autores, os efeitos do F na degradação das proteínas da matriz são devidos ao fato de o F agir diretamente na atividade das proteases da matriz extracelular, reduzindo a degradação das proteínas (DENBESTEN; HEFFERNAN, 1989; DENBESTEN et al., 2002; ROBINSON et al., 2006; TANABE et al., 1988; TANIMOTO et al., 2008), alterar as características de adsorção, área de superfície e/ou propriedade de superfície dos cristais, alterando sua aderência à matriz proteica, desta forma alterando a degradação proteolítica e causando retenção da matriz orgânica (KIRKHAM et al., 2001; ROBINSON et al., 2006; TANABE et al., 1988; TANIMOTO et al., 2008). Tem sido ainda relatados efeitos na redução dos níveis de Ca^{+2} no fluido do esmalte necessários para a atividade das proteases (DENBESTEN et al., 1992; DENBESTEN et al., 2002), prejuízo na endocitose e na degradação da matriz extracelular durante a modulação dos ameloblastos (SMID et al., 1990) e aumento da apoptose dos ameloblastos do estágio de maturação (NISHIKAWA; JOSEPHSEN, 1987). Tais mecanismos, portanto, estariam envolvidos na redução do número de ameloblastos do estágio de maturação e, conseqüentemente, na redução da capacidade de degradação e remoção da matriz orgânica durante a mineralização do esmalte. Apesar de inúmeros estudos, ainda continua incerto o mecanismo molecular primário envolvido na perturbação do desenvolvimento do esmalte (BRONCKERS; LYARUU; DENBESTEN, 2009).

Recentemente, foi aventada a hipótese de que o baixo pH extracelular no estágio de maturação pudesse aumentar a sensibilidade dos ameloblastos ao F (SHARMA et al., 2010). Para isso, os autores avaliaram a dose limite de F (0, 50, 100 e 150 mg/L de F) necessária para induzir estresse nos ameloblastos e causar diminuição da secreção das proteínas durante a formação do esmalte. Ainda nesse estudo foi questionado se os ameloblastos do estágio de maturação do esmalte de incisivos de ratos, naturalmente expostos a baixo pHs, são mais sensíveis ao F, quando comparados aos ameloblastos do estágio secretor. Os resultados demonstraram que nos ratos que receberam 100 mg/L de F na água de beber, foi observado estresse nos ameloblastos do estágio de maturação, quando comparados aos ameloblastos do estágio de secreção e, também, observou-se uma diminuição na expressão de KLK4 no estágio de maturação do esmalte. Curiosamente, a expressão de AMELs, AMBN, ENAM e MMP20 no estágio de secreção não foram afetadas (SHARMA et al., 2010).

Posteriormente, o mesmo grupo de pesquisa (SHARMA et al., 2011) realizou um estudo em camundongos mutados para um alelo de MMP20 (*Mmp20*^{+/-}), avaliando a susceptibilidade genética à fluorose e a relação da redução da atividade proteolítica observada nos esmaltes com fluorose. Para tanto, os camundongos foram expostos às concentrações de 0 e 50 mg/L de F, na água de beber, por 6 semanas. Após o tratamento, foram avaliados o nível de expressão da MMP20 por RT-PCR (molares) e a severidade da fluorose (incisivos) através de análises clínicas, QLF e teste de microdureza *Vickers*. Os resultados demonstraram que os camundongos *Mmp20*^{+/-} expressavam metade dos níveis normais de MMP20, quando comparados aos camundongos *Mmp20*^{+/+} (linhagem selvagem), apresentavam esmalte com aparência normal e microdureza *vickers* similar aos camundongos *Mmp20*^{+/+}. Os autores concluíram que a redução da atividade da MMP20 não é o único fator responsável pela retenção de proteínas na matriz e, conseqüentemente, na ocorrência da fluorose (SHARMA et al., 2011).

A degradação das proteínas da matriz por enzimas proteolíticas específicas do esmalte (MMP20, KLK4) é um processo considerado crítico para a formação do esmalte (BARTLETT; SIMMER, 1999; BARTLETT et al., 2011; BARTLETT; SMITH, 2013; HU et al., 2011; LU et al., 2008; SIMMER; HU, 2001, 2002; SIMMER et al., 2011a; SIMMER et al., 2012; SIMMER et al., 2011b). Diversos estudos experimentais em animais com mutação para as proteases, resultam em amelogenese imperfeita, uma condição caracterizada por hipomineralização do esmalte, retenção e atraso da remoção do conteúdo proteico (HART et al., 2004; KIM et al., 2005; LEE et al., 2010; OZDEMIR et al., 2005; PAPAGERAKIS et al., 2008; WRIGHT et al., 2006). No entanto, alguns estudos verificaram o efeito do F na atividade de outros tipos de proteases, identificadas no esmalte em formação (DENBESTEN et al., 1989; TYE; ANTONE; BARTLETT, 2011; TYE; LORENZ; BARTLETT, 2009). Um estudo (DENBESTEN; CRENSHAW, 1987) identificou uma caseinase em esmalte de ratos no estágio de secreção, que foi inibida pelo EDTA. Esses resultados indicaram a presença de uma metaloprotease que degrada caseína na matriz do esmalte no estágio de secreção. Um tipo de protease menos comum de ser identificada na matriz do esmalte é a **estromelisina (MMP3)**. Posteriormente, o mesmo grupo de pesquisa realizou um estudo utilizando anticorpo para MMP3, secretada da matriz de condrócitos, para identificar essa protease na matriz do esmalte. A capacidade da MMP3 para digerir AMELs foi também determinada. Os resultados mostraram que a MMP3 estava presente na matriz do esmalte em desenvolvimento. Mesmo sendo sua função desconhecida nesse tecido, os autores sugeriram que a MMP3 participa da hidrólise da AMELs (DENBESTEN et al., 1989).

O efeito do F tem sido foco de pesquisas que visam a identificar diferentes tipos de proteases da matriz do esmalte envolvidas no processo de mineralização dentária. A *cathepsin K* é uma cisteína protease expressa em osteoclastos e sua função está diretamente envolvida na reabsorção óssea. A expressão de *cathepsin K* no dente em desenvolvimento ainda continua sendo pouco estudada, no entanto, recentemente a *cathepsin K* foi identificada no órgão de esmalte do estágio de maturação de uma matriz lisossomal de proteases (TYE; LORENZ; BARTLETT, 2009). O principal mecanismo pelo qual a matriz do esmalte não é adequadamente removida na fluorose dentária, continua sendo bastante estudado. Tem sido discutido diversas hipóteses que incluem, a redução da secreção de enzimas de degradação (MMP20, KLK4), redução da absorção de proteínas, e atraso e/ou redução da degradação da matriz proteica do esmalte (BRONCKERS; LYARUU; DENBESTEN, 2009). Diante disso, um estudo recente analisou o efeito do F na atividade enzimática da KLK4, MMP20 e da protease lisossomal *cathepsin K*. A cinética enzimática foi avaliada na presença de NaF em concentrações variando de 0 a 10 mmol/l. Os autores concluíram que nas concentrações estudadas (0-10 mmol/l de F) não foi observado efeito negativo do F sobre as atividades das proteases KLK4, MMP20 e *cathepsin K*, isto é, o F não inibiu a atividade proteolítica no esmalte (TYE; ANTONE; BARTLETT, 2011).

De qualquer modo, as hipóteses relacionadas ao comportamento da matriz proteica do esmalte frente ao excesso de F ainda continua sendo bastante estudada. A retenção de proteínas AMELs pode atrasar a mineralização final da matriz de esmalte, contribuindo para a hipomineralização da subsuperfície característica da fluorose. A razão para essa retenção de AMELs está provavelmente relacionado com a atividade proteolítica alterada na matriz do esmalte fluorose (DENBESTEN; LI, 2011). Futuros estudos devem ser incentivados para o melhor entendimento do complexo processo de formação da matriz do esmalte e os efeitos do F diante desse processo, bem como avaliar o possível envolvimento de outras proteases ainda não identificadas no esmalte neste processo.

2.2.4 Efeitos do F na iniciação e crescimento dos cristais

As dinâmicas de crescimento dos cristais, tamanho e a sua forma, são controladas pelas proteínas da matriz durante a formação do esmalte (SIMMER; FINCHAM, 1995; SMITH; NANCI, 1996). Alguns estudos têm relatado que os cristais de esmalte com fluorose apresentam diâmetro significativamente maior do que os cristais de esmalte normais, conforme analisado por microscopia eletrônica de alta resolução, difração de raios-X de amostras de esmalte em pó e microscopia de espécimes de esmaltes fraturados (KEREBEL; DACULSI, 1976; SUNDSTROM; JONGEBLOED; ARENDS, 1978). Estudos de cultura de órgãos do esmalte, têm demonstrado a presença de cristais grandes, hexagonais, achatados e misturados com pequenos cristais de forma irregular em áreas hipermineralizadas (YANAGISAWA; TAKUMA; FEJERSKOV, 1989; YANAGISAWA et al., 1989). No entanto, estudos prévios mostraram que os cristais de esmalte com e sem fluorose não apresentam diferenças estruturais (FEJERSKOV; JOHNSON; SILVERSTONE, 1974; ROBINSON et al., 2006).

A falta de remoção das proteínas do esmalte pode ser considerada como a responsável pela diminuição na quantidade e no índice de nucleação dos cristais de apatita do esmalte (AOBA et al., 1992). Essa hipótese foi demonstrada por autores (AOBA et al., 1987) que observaram, *in vitro*, o potencial de inibição de crescimento cristalino exercido pelas proteínas do esmalte. Uma interferência na degradação dessas proteínas poderia estar associada à permanência prolongada das mesmas e, conseqüentemente, à deficiência de mineralização (ROBINSON et al., 1998).

O início do estágio de maturação parece apresentar uma susceptibilidade maior aos efeitos negativos do F, podendo gerar inibição da atividade proteolítica na matriz resultando na retenção de material orgânico. Os achados de Lyaruu et al. (1987) indicaram que a matriz sintetizada e secretada na presença de 10 mg/L de F, em culturas de germes dentários de *hamsters*, mantém sua capacidade de sustentar o crescimento dos cristais quando o F é removido do meio. Acredita-se que as AMELs controlam a orientação do crescimento dos cristais em extensão durante o processo de mineralização do esmalte. A administração de F, *in vitro*, durante o estágio de secreção da amelogênese inibe esse crescimento, indicando que o F rompe temporariamente o controle das AMELs durante o processo de mineralização do esmalte (LYARUU et al., 1987).

A demonstração morfológica da alteração na maturação do esmalte por atraso na remoção da matriz proteica, foi abordada por autores que utilizaram avaliações morfométricas

e auto-radiográficas, em incisivos de ratos expostos cronicamente a doses de 75 e 100 mg/L de F, no período de seis semanas. Ao mensurarem o comprimento da matriz na região pós-secretora, observaram que seu comprimento era maior nos grupos com fluorose em relação ao controle, o que seria uma confirmação morfológica do atraso da degradação e reabsorção das proteínas da matriz, causando hipomineralização do esmalte (ZHOU; ZAKI; EISENMANN, 1996).

O esmalte fluorótico se apresenta mais poroso e menos mineralizado, possivelmente por alterações na degradação e reabsorção das AMELs. A AMEL é a proteína mais abundante da matriz do esmalte em formação e, apresenta função de modulação no crescimento dos cristais (FINCHAM; MORADIAN-OLDAK; SIMMER, 1999; GIBSON et al., 2001). Foi relatado que quando AMEL se liga à superfície do cristal, ocorre a inibição do seu crescimento (AOBA; MORENO, 1987). Presumivelmente, a correta hidrólise da AMEL pelas proteases da matriz do esmalte, incluindo MMP20 e KLK4 (HU et al., 2002), resulta em um ordenado crescimento dos cristais. Qualquer distúrbio nesse processo altera o desenvolvimento do esmalte. Diante disso, foi realizado um estudo para determinar se o F altera as propriedades de superfície das apatitas (similarmente aos achados no esmalte dentário), afetando a interação das AMELs com os cristais de apatitas, resultando na fluorose (TANIMOTO et al., 2008). Nesse estudo, inicialmente, foi avaliado, se a incorporação de F em hidroxiapatitas carbonatadas sintéticas poderia alterar a ligação da AMEL na apatita. Em seguida, procurou-se avaliar a interação da AMEL com a apatita examinando os efeitos do F em solução, na ligação às proteínas. A taxa inicial de ligação à AMEL e a quantidade total de AMEL ligada à apatita carbonatada contendo F foi maior do que na apatita controle, sem F (TANIMOTO et al., 2008). Esses resultados indicam que a incorporação de F na trama cristalina altera a superfície do cristal, aumentando a ligação da AMEL, resultando no aumento da quantidade de AMEL e na inibição do crescimento dos cristais no esmalte fluorótico (DENBESTEN; LI, 2011).

Estudos mais aprofundados (DENBESTEN; LI, 2011; DENBESTEN et al., 2011; TANIMOTO et al., 2008) foram realizados para elucidar o papel do F incorporado na apatita carbonatada, no processamento e hidrólise da AMEL e na interação da AMEL com os cristais. Para isso, Denbesten et al. (DENBESTEN et al., 2011) caracterizaram a hidrólise da AMEL pela MMP20 e KLK4 em apatitas carbonatadas (sintéticas) contendo F (F-CAP) ou não (CAP) nas concentrações de 100, 1,000 e 4,000 mg/L de F. Quando o F estava em solução, a hidrólise da AMEL pela MMP20 foi apenas reduzida na concentração de 1,000 mg/L de F (52 mM), o que é muito mais elevado do que os níveis fisiológicos de F nos fluidos do esmalte.

No entanto, a incorporação de F na apatita (F-CAP) atrasou significativamente a hidrólise da AMEL pela MMP20, de um modo dependente da dose, mesmo nas F-CAP em concentrações mais baixas de 100 mg/L de F. Efeito similar (redução na hidrólise da AMEL) foi quando as AMELs foram hidrolisadas a partir de apatitas contendo F (F-CAP), utilizando KLK4 recombinante.

Os níveis de F incorporado nos cristais de apatita mostrados nesses estudos *in vitro*, são biologicamente relevantes. Embora o fluido do esmalte que envolve os ameloblastos provavelmente apresente não mais do que 10 µmol/l de F (0,19 mg/L de F), o F é incorporado nos cristais em crescimento em concentrações variando de 10 mg/L de F próximo à JAD até centenas de ppm na superfície do esmalte (RICHARDS; FEJERSKOV; BAELUM, 1989). Em dentes com fluorose leve, a concentração de F no interior da camada do esmalte (300 µm da superfície) nos dentes humanos é de 100 mg/L de F (RICHARDS; FEJERSKOV; BAELUM, 1989). Nas camadas intermediárias do esmalte de dentes severamente afetados pela fluorose (150 µm da superfície), a concentração de F é aproximadamente 2000 mg/L de F (RICHARDS; FEJERSKOV; BAELUM, 1989). Portanto, a redução da hidrólise de AMEL no estágio de maturação de esmaltes com fluorose (AOBA et al., 1990; BRONCKERS, A.L. et al., 2002) pode ser devida à redução na taxa de hidrólise de AMELs ligadas aos cristais contendo F.

Os efeitos da incorporação do F na apatita e na hidrólise de AMEL são consistentes com a observação de hipomineralização da subsuperfície, podendo ocorrer somente no estágio de maturação do esmalte (DENBESTEN; CRENSHAW; WILSON, 1985; RICHARDS; KRAGSTRUP; NIELSEN-KUDSK, 1985; SUCKLING; THURLEY; NELSON, 1988). Defeitos na mineralização de incisivos de ratos com fluorose, no estágio de maturação são caracterizados pela formação de áreas hipomineralizadas generalizadas na subsuperfície, ao longo de toda a coroa de esmalte (ANGMAR-MANSSON; WHITFORD, 1982, 1984; KIERDORF et al., 2004; RICHARDS et al., 1992; SHINODA, 1975). Esse tipo de defeito se correlaciona com as opacidades brancas porosas visualizadas clinicamente no esmalte.

2.2.5 Efeitos do F no pH da matriz do esmalte

A remoção das proteínas da matriz também é influenciada por alterações de pH mediadas pelo F durante a formação dos cristais de apatita. A formação da apatita é resultante da formação de um número substancial de prótons $[10\text{Ca}^{2+} + 6\text{HPO}_4^{2-} + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2 + 8\text{H}^+]$ que precisam ser neutralizado. A AMEL ligam até 12 prótons por

molécula (RYU; HU; SIMMER, 1998). Contudo, se esse sistema de tamponamento da AMEL não está disponível, ou está saturado, é concebível que uma queda de pH induzida pelo F pode alterar a estrutura terciária da AMEL e afetar a sua função (ZHENG et al., 2011).

As AMELs secretadas pelos ameloblastos do estágio de secreção podem apresentar grande contribuição na homeostasia do pH nesse estágio da amelogênese, em que o pH é mantido neutro (BRONCKERS; LYARUU; DENBESTEN, 2009; SIMMER; FINCHAM, 1995). No final do estágio de secreção, as proteases da matriz do esmalte são ativadas, e, no estágio de transição/maturação, as proteínas da matriz do esmalte são rapidamente removidas. Nessa fase, as junções celulares entre os ameloblastos estão abertas, para permitir que o F se movimente prontamente a partir do fluido da matriz do esmalte. A presença de um aumento na quantidade de F no estágio de transição/maturação pode tornar esse estágio altamente susceptível aos efeitos do F durante a formação do esmalte.

No estágio de maturação do esmalte, o pH da matriz muda periodicamente entre ácido (pH 5,8) e neutro (pH 7,2) através da modulação cíclica dos ameloblastos desse estágio (SASAKI; TAKAGI; SUZUKI, 1991; SMITH, 1998). Se assumirmos que a acidificação da matriz do esmalte promove a modulação dos ameloblastos de borda pregueada para os de borda lisa, na fluorose dentária, as alterações no pH da matriz podem contribuir para um atraso na transição dos ameloblastos de borda pregueada para borda lisa, resultando em menos modulações ameloblastos. Esse atraso na modulação dos ameloblastos (o que é uma característica dos ameloblastos do estágio de maturação na fluorose) poderia contribuir para o atraso na remoção de AMEL (DENBESTEN; LI, 2011).

Particularmente, no final do estágio de maturação do esmalte, Bronckers et al. (BRONCKERS; LYARUU; DENBESTEN, 2009), descreveram a hipótese de que o F na matriz do esmalte pode aumentar a mineralização, resultando em uma hipermineralização localizada, exigindo dos ameloblastos, bombeamento de bicarbonato adicional para dentro da matriz extracelular do esmalte. Essa hipermineralização esgotaria o reservatório local ou íons de Ca^{+2} livres, resultando numa banda hipomineralizada no esmalte. Essa hipótese é apoiada por um estudo recente que mostrou aumento da expressão do RNAm para uma proteína com importante função reguladora de pH, a NBCe1 em ameloblastos do estágio de maturação do esmalte com fluorose, quando comparados aos ameloblastos do estágio de maturação controles (ZHENG et al., 2011).

Vários transportadores de íons estão envolvidos na regulação do pH da matriz do esmalte em mineralização (BRONCKERS et al., 2010; JOSEPHSEN et al., 2010). Através da análise de imunohistoquímica, a NHE1 e a $\text{H}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$, foram detectadas na membrana

basolateral dos ameloblastos durante a amelogênese (JOSEPHSEN et al., 2010; SASAKI et al., 1988). A CFTR (envolvida na endocitose em ameloblastos), uma proteína importante que funciona como canal de trocas de cloreto (Cl/HCO_3^-), foi detectada na membrana apical de ameloblastos do estágio de maturação (BRONCKERS et al., 2010). Com deleção na CFTR e AE2, incisivos de ratos são formados com aparência de giz branco (LYARUU et al., 2008; WRIGHT et al., 1996b), o que denota a importância da regulação do pH durante a formação do esmalte. A NBCe1 é também considerada como reguladora do pH durante a formação do esmalte (PAINE et al., 2008). Defeitos de mineralização do esmalte são observados em camundongos mutantes para NBCe1 (DINOUR et al., 2004; GAWENIS et al., 2007). Supressão de NBCe1 ($^{-/-}$) em ratos resulta em esmalte hipomineralizado e numa fraca arquitetura prismática, embora o perfil de expressão de AMEL permaneça inalterado (LACRUZ et al., 2010c). Diante desses achados, foi realizado um estudo para localizar a NBCe1 em dentes humanos e de roedores, e os níveis de expressão em ameloblastos diferenciados (pré-ameloblastos, ameloblastos do estágio pré-secretor e do estágio de secreção) (ZHENG et al., 2011). Foram investigados os efeitos do ambiente da matriz e a expressão de NBCe1, comparando com a expressão em ratos expostos ao F durante a formação do esmalte, e em ameloblastos humanos expostos ao F e à redução de pH *in vitro*. A análise de PCR mostrou transcritos para NBCe1-A presentes nos ameloblastos humanos, ao passo que, em ameloblastos de ratos foi observada a expressão da NBCe1-B. Hibridização *in situ* e PCR em incisivos de ratos e humanos mostraram que NBCe1 apresentou aumento de expressão em todos os tipos de ameloblastos. Ingestão de 50 mg/L de F resultou num aumento de expressão da NBCe1 nos ameloblastos do estágio de maturação em comparação com os controles. NBCe1 apresentou aumento de expressão em baixos pH, mas não na presença de F, em ameloblastos humanos. O aumento da regulação da NBCe1 *in vivo* no progresso da maturação e mineralização do esmalte, promove evidências de que a NBCe1 participa na modulação do pH durante a formação do esmalte. Concluiu-se que há um aumento na expressão da NBCe1 em ameloblastos do estágio de maturação do esmalte com fluorose, na presença de F, reforçando a hipótese de que a exposição ao F resulta na acidificação da matriz do esmalte em mineralização (ZHENG et al., 2011).

2.3 SUSCEPTIBILIDADE GENÉTICA À FLUOROSE DENTÁRIA

Nas últimas décadas, o estudo da herança genética individual vem contribuído para uma nova visão sobre os efeitos fisiológicos do F. A susceptibilidade genética à fluorose dentária tem sido alvo de diversas pesquisas, tanto em humanos quanto em modelos

experimentais em animais (CARVALHO et al., 2009; EVERETT, 2011; EVERETT et al., 2002; EVERETT et al., 2009; EVERETT et al., 2011; HUANG, H. et al., 2008; VIEIRA et al., 2005a; YAN et al., 2011). Frequentemente, os estudos utilizam como modelo experimental dentes incisivos de ratos ou camundongos, que apresentam erupção contínua, pelo fato de todos os estágios de desenvolvimento da amelogênese estarem presentes. Tais características têm contribuído substancialmente para a compreensão das interações dos importantes processos celulares, moleculares e genéticos. Observações epidemiológicas de grande variação na prevalência e severidade da fluorose em indivíduos com ingestão aparentemente similar de F (BUZALAF; WHITFORD, 2011; MABELYA et al., 1994; YODER et al., 1998), bem como estudos mostrando diferentes graus de susceptibilidade à fluorose entre certos grupos étnicos (BUTLER; SEGRETO; COLLINS, 1985; RUSSELL, 1962; WILLIAMS; ZWEMER, 1990) levaram à pressuposição de que a susceptibilidade à fluorose dentária poderia ser geneticamente determinada.

Foi conduzido um estudo em crianças da Tanzânia, em áreas distintas, que diferiam quanto a concentração de F na água e altitude. Observou-se que mesmo nas duas áreas que apresentavam elevada ocorrência de fluorose severa, várias crianças apresentavam pouca evidência de distúrbios no esmalte dentário (YODER et al., 1998). Essas crianças “resistentes” à fluorose dentária, residiam na mesma área das mesmas crianças “susceptíveis”. Os valores das concentrações de F na urina e na refeição das crianças foram também similares entre os dois grupos. A questão da possível influência genética torna-se mais evidente nesse estudo, devido à homogeneidade tribal dessa área.

A possibilidade de susceptibilidade genética à fluorose foi estudada utilizando-se camundongos como modelo experimental, sendo que o genótipo, a idade, o gênero, a alimentação e os níveis de F na água de consumo dos animais foram rigorosamente controlados (EVERETT et al., 2002). Observou-se diferença na susceptibilidade e resistência à fluorose dentária entre as 12 linhagens de camundongos estudadas. A linhagem de camundongos A/J mostrou-se ser altamente susceptível, com um rápido e severo desenvolvimento da fluorose dentária quando comparada com as outras linhagens testadas, enquanto que, a linhagem de camundongos 129P3/J mostrou-se pouco afetada, apresentando uma fluorose dentária leve. Nesse estudo, o acúmulo de F nos fêmures e nos incisivos foi avaliado como indicador da exposição ao F. Os resultados demonstraram que houve uma correlação significativa entre a concentração de F na água de consumo e a concentração de F nos fêmures, bem como entre a concentração de F na água e a concentração de F nos incisivos. Além disso, todos os camundongos acumularam quantidades similares de F nos

fêmures e nos incisivos, independente do grau de fluorose que apresentaram. Esse fato levou os autores a sugerirem que a eliminação do F pelo organismo não é uma explicação suficiente para a resistência à fluorose dentária. Posteriormente, um estudo metabólico mostrou que, contrariamente ao que era esperado, os animais da linhagem 129P3/J retêm mais F no organismo, o que faz seus níveis de F no fêmur e plasma serem maiores que aqueles encontrados nos animais da linhagem A/J. Esse achado é surpreendente, uma vez que a despeito dos maiores níveis circulantes de F, os animais da linhagem 129P3/J mostraram-se resistentes à fluorose dentária, que não se manifestou mesmo com a ingestão de água contendo 50 mg/L de F (CARVALHO et al., 2009).

No intuito de investigar a região cromossômica associada à fluorose dentária, (susceptibilidade genética à fluorose dentária), camundongos isogênicos de ambas as linhagens A/J (susceptíveis) e 129P3/J (resistentes) foram tratados com 0 e 50 mg/L de F na água de beber por 60 dias (EVERETT et al., 2009). Locus de características quantitativas (QTL) associadas à fluorose dentária foram detectados nos cromossomos 2 e 11 destes camundongos. O exame histológico do esmalte maturado mostrou que o tratamento com F, resultou no acúmulo de AMELs nos esmaltes dos camundongos da linhagem A/J (susceptíveis), não sendo observado nos camundongos da linhagem 129P3/J (resistentes), sugerindo que pode existir diferenças inerentes à formação do esmalte dentário entre as linhagens. Esse achado foi relacionado a estudos prévios utilizando microdureza do esmalte de incisivos das duas linhagens, onde foi observado que o esmalte de incisivos da linhagem 129P3/J é cerca de 22% mais dura do que a do A/J (VIEIRA et al., 2005a). No entanto, os mecanismos bioquímicos e moleculares envolvidos nos diferentes efeitos do F no esmalte dentário, influenciados pela genética, ainda são desconhecidos (BUZALAF; WHITFORD, 2011). Também foram encontradas alterações no perfil proteômico renal (CARVALHO et al., 2013) e ósseo (KOBAYASHI, 2012) dos camundongos dessas linhagens.

Em humanos, a possibilidade do envolvimento genético foi investigada através da relação do polimorfismo do gene *Col1a2* (que codifica a proteína **COL1A2**) com ocorrência da fluorose dentária (HUANG, H. et al., 2008). Estudos prévios relataram a frequência do gene *Col1a2* em diferentes populações (CONSTANTINOU et al., 1990; LIU et al., 2005; RICKARDS et al., 2005; SUURINIEMI et al., 2003), no entanto, o efeito da diferença de expressão gênica ainda não é claro. Um estudo caso-controle foi conduzido em crianças de 8 a 12 anos de idade, com (n=75) e sem (n=165) fluorose dentária, em duas províncias chinesas. Os polimorfismos PvuII e RsaI do gene *Col1a2* foram avaliados. Os níveis plasmáticos de calcitonina e osteocalcina também foram mensurados. Os resultados evidenciaram que o

polimorfismo do gene *Colla2* está associado ao risco de fluorose em populações expostas à níveis elevados de F (HUANG, H. et al., 2008), mas não em áreas não endêmicas de fluorose.

2.4 ANÁLISE PROTEÔMICA

O avanço dos projetos genômicos deu-se em virtude da automação dos métodos de análises dos ácidos nucleicos, como PCR, sequenciamento automático e *microarrays*, o que permitiu a análise genômica em larga escala, tanto de organismos procariotos como eucariotos (WILKINS et al., 1997). O término do sequenciamento de nucleotídeos dos genomas de uma variedade de organismos, inclusive o genoma humano, é uma grande conquista da biologia molecular. Entretanto, as informações obtidas pela genômica não descrevem a dinâmica dos processos ao longo da vida ocorridos nas células e organismos, pois, embora os padrões comportamentais das células certamente reflitam a informação armazenada no genoma, são as proteínas que de fato desempenham papéis fundamentais nos sistemas biológicos.

A utilização de proteínas como biomarcadores moleculares tem contribuído para a elucidação de diagnósticos precoces e tratamentos de diversas doenças. Os biomarcadores podem ser definidos como uma característica que é medida e avaliada como indicador de um processo biológico normal, patogênico, ou respostas farmacológicas a uma intervenção terapêutica (ATKINSON et al., 2001). Espera-se que um biomarcador seja capaz de fornecer, precocemente, informações que permitam a obtenção de respostas precisas ou que possa pelo menos aumentar a probabilidade de acerto a certas questões, como se o indivíduo está doente, se a doença está evoluindo ou ainda se a terapia aplicada está apresentando efeitos satisfatórios. Desse modo, os estudos envolvendo biomarcadores são de extrema importância, uma vez que não só auxiliam na detecção precoce das doenças, como também auxiliam a monitorá-las perante um tratamento (GILLETTE; MANI; CARR, 2005).

Muitos estudos sobre biomarcadores envolvem a comparação do padrão de proteínas constituinte de uma amostra saudável com o de uma amostra afetada. As proteínas desempenham papéis fundamentais nos sistemas biológicos. Suas atividades específicas, estado de modificação, associação com outras biomoléculas e os níveis de expressão são essenciais para o desempenho ideal das funções celulares, promovendo o crescimento, a diferenciação, a proliferação e a morte celular. Por isso, as proteínas são moléculas de grande interesse na busca por biomarcadores confiáveis, uma vez que diferenças, não só nos níveis de expressão, mas também nas estruturas protéicas, geralmente indicam um quadro patológico (HANCOCK, 2003; VLAHOU; FOUNTOULAKIS, 2005).

As proteínas desempenham papéis fundamentais nos sistemas biológicos, sendo as responsáveis pelo fenótipo definitivo da célula. Suas atividades específicas, estado de modificação, associação com outras biomoléculas e os níveis de expressão são essenciais para a descrição dos sistemas biológicos. Desse modo, torna-se impossível elucidar os diversos mecanismos que interagem em um determinado organismo apenas pelo estudo da expressão gênica. Em virtude disso, surgiu uma nova abordagem experimental na Biologia conhecida como **análise proteômica**, que consiste de um conjunto de ferramentas empregadas para caracterizar, qualitativamente e quantitativamente, um conjunto de proteínas expressas por um dado genoma. A esse conjunto de proteínas denominou-se de **PROTEOMA** (WILKINS et al., 1997).

Contrariamente ao genoma, que é praticamente constante e não muda com o tempo, o proteoma é altamente dinâmico. Assim, um único genoma pode gerar um número muito grande de proteomas, dependendo do embaralhamento de éxons, de modificações transcricionais dos RNAs mensageiros e modificações co- e pós-tradução das proteínas (como acilação, alquilação, carboxilação, fosforilação, metilação, dentre outras), além de variáveis como estágio de crescimento, nutrição, estresse e estado patológico do organismo (THONGBOONKERD, 2004; WILKINS et al., 1996). A análise global das proteínas tem se constituído de múltiplas técnicas que abrangem não somente seu aspecto funcional no contexto celular (microscopia eletrônica e confocal, análise de interações entre proteínas, cristalização de proteínas, dentre outras) como também técnicas que abrangem o isolamento e identificação de proteínas em larga escala (cromatografia líquida, eletroforese bidimensional e espectrometria de massas).

A análise proteômica, desenvolvida há pouco mais de uma década, surgiu como uma abordagem sistemática para o mapeamento qualitativo e quantitativo de todo o proteoma, diferindo das abordagens moleculares convencionais que são capazes de analisar um número limitado de proteínas (ZHANG et al., 2010). Além de estudos proteômicos sobre o perfil global de proteínas presentes em um sistema em um dado momento, o número de estudos trazendo informações sobre o nível de expressão proteica também vem crescendo nos últimos anos (ZHU; SMITH; HUANG, 2010). A quantificação de diferenças entre dois ou mais estados fisiológicos de um sistema biológico é uma das tarefas mais importantes, assim como um dos maiores desafios das técnicas proteômicas (BANTSCHIEFF et al., 2007). Até o presente momento, não existe nenhum método ou instrumento que seja capaz de identificar e quantificar uma mistura complexa de proteínas em uma simples e única etapa de operação. Ao contrário, métodos individuais para separar, identificar e quantificar proteínas, assim como

ferramentas para integrar e analisar todos os dados, devem ser usados em conjunto (AEBERSOLD; MANN, 2003). Dentre as múltiplas técnicas e instrumentos, algumas estratégias vêm sendo comumente utilizadas. A eletroforese bidimensional, combinada com a identificação de proteínas por espectrometria de massas, foi a ferramenta de escolha para o presente trabalho (GORG; WEISS; DUNN, 2004). Uma visão geral desta técnica será apresentada abaixo.

2.4.1 Eletroforese Bidimensional (2DE)

A 2DE, desenvolvida por O'Farrell e Klose (KLOSE, 1975; O'FARRELL, 1975), é uma técnica de separação amplamente utilizada para a análise de misturas complexas de proteínas extraídas de células, tecidos ou outras amostras biológicas. Essa técnica promove a separação das proteínas em duas dimensões, de acordo com duas propriedades independentes. Na primeira dimensão, **focalização isoeétrica (IEF)**, as proteínas são separadas de acordo com seus pontos isoeletricos (pI). Na segunda dimensão, uma **eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)** separa as proteínas de acordo com suas massas moleculares (MM) relativas (figura 1) (WESTERMEIER; NAVEN, 2002).

Figura 1. Etapas envolvidas no processo de separação de proteínas por eletroforese bidimensional. Inicialmente, as proteínas solubilizadas de uma amostra são separadas de acordo com o seu pI (primeira dimensão). Após a focalização, as mesmas são transferidas para um gel de poliacrilamida, onde são separadas de acordo com sua massa molecular relativa (segunda dimensão) (LEITE, 2010).

Proteínas são moléculas anfóteras, ou seja, podem apresentar carga líquida positiva, negativa ou neutra, dependendo de sua estrutura primária (dos aminoácidos que a compõem) e do pH do meio. Dessa forma, em um gradiente de pH e sob a influência de um campo elétrico, as proteínas irão migrar para a posição do gradiente na qual sua carga líquida será zero, focalizando-se neste ponto, onde o valor de pH é numericamente igual ao pI (NELSON; COX, 2002). Na metodologia original, a IEF das proteínas era realizada em um tubo de gel de poliacrilamida, onde um gradiente de pH era estabelecido por meio de uma pré-corrida com anfólitos carreadores específicos, que apresentam alta capacidade tamponante em pHs próximos aos seus pIs. Atualmente, o uso desses anfólitos carreadores geradores foi substituído por fitas com gradientes de pH imobilizados (*immobilized pH gradient - IPG*), fabricadas por uma reação de copolimerização de monômeros de acrilamida, bisacrilamida e acrilamidas modificadas. Essas últimas possuem em sua estrutura grupamentos R, os quais podem ser ácidos ou bases fracas com valores de pKa bem estabelecidos (WESTERMEIER; NAVEN, 2002).

As proteínas previamente separadas pela IEF são então transferidas para um gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), que realizará uma nova separação, mas agora baseada na MM das proteínas. O gel de poliacrilamida é formado pela mistura dos monômeros acrilamida e bisacrilamida, sendo a porosidade do mesmo, determinada por dois parâmetros: a porcentagem total de acrilamidas (%T) e a razão de entrecruzamento, proporcionado pela bisacrilamida (%C). Quanto maior for a %T, menor será o poro da malha, e por isso a escolha da concentração do gel é um parâmetro de extrema importância para que se tenha uma boa separação (CANTU, 2007; GE-HEALTHCARE, 2004). Antes de iniciar a eletroforese, as variáveis forma e carga da proteína devem ser eliminadas, para que a separação dependa exclusivamente de sua MM. Para isso, as mesmas são lavadas com uma solução contendo ditioneína (DTT) e SDS. O DTT é um agente redutor cuja função é desfazer as pontes dissulfeto, eliminando assim a forma nativa da proteína e conferindo-lhe uma conformação linear. O SDS é um tensoativo aniônico que se associa às proteínas numa proporção de aproximadamente 1,4 g de SDS por grama de proteína, tornando-as assim negativamente carregadas, o que fará com que a migração das mesmas dependa basicamente de sua massa molecular (GE-HEALTHCARE, 2004).

Após a realização da eletroforese, o gel deve ser corado para visualização das proteínas. O método ideal de coloração deve ser sensível para detectar concentrações extremamente baixas de proteínas, ter uma faixa dinâmica de detecção, linearidade, reprodutibilidade entre experimentos e compatibilidade com métodos de identificação. Os

métodos de coloração mais comumente utilizados são os que utilizam a coloração por prata ou por azul de *Coomassie* (CANDIANO et al., 2004). A coloração por prata (Ag^+) é o método colorimétrico mais sensível existente (1 ng/spot), porém, de difícil quantificação, visto que, a intensidade da coloração é saturável e depende do tempo de revelação. O princípio é saturar o gel com íons de prata e reduzir a prata que interage com as proteínas, a prata metálica (Ag^0) (REINDERS; SICKMANN, 2002).

O azul de *Coomassie* é o método colorimétrico pós-eletroforese mais confiável para quantificação dos spots, já que apresenta linearidade quantitativa na faixa de concentração de proteína de 10-100 ng/spot. Trata-se de um corante orgânico que é atraído pelos grupamentos carregados das proteínas, formando fortes complexos corante/proteína. O azul de *Comassie* pode ser encontrado nas versões G-250 e R-250, onde a letra G indica que o corante apresenta uma coloração esverdeada, ao passo que R indica que uma coloração avermelhada. O número 250 é um indicador da força do corante. Os aminoácidos básicos apresentam particular influência na interação entre moléculas de *Comassie* e proteínas, uma vez que existe uma correlação proporcional entre a intensidade da coloração e o número de resíduos de lisinas, histidinas e argininas na proteína. Embora não se possa negar que a prata seja muito mais sensível que o *Coomassie*, muitos cientistas que trabalham com análises proteômicas diferencial e quantitativa preferem os corantes orgânicos como o *Coomassie*. Isso se deve ao fato de que a menor sensibilidade do *Coomassie* é compensada amplamente pela maior reprodutibilidade, pois, ao contrário da prata, possui protocolos mais simples com menos chances de erros (CANDIANO et al., 2004). Outra vantagem da coloração com *Coomassie* é que o mesmo não interfere na análise por espectrometria de massa dos spots de proteínas visualizados (CANDIANO et al., 2004; REINDERS; SICKMANN, 2002).

2.4.2 Espectrometria de Massas (*Mass Spectrometry - MS*)

Mesmo sendo a 2DE uma poderosa ferramenta analítica, essa técnica somente permite detectar proteínas, atribuindo a elas pI e MM, mas não é capaz de identificá-las. Ao visualizar um perfil 2DE, não temos como saber quais proteínas representam cada um dos spots. Porém, quando a MS é integrada como método pós-2DE, uma ferramenta poderosa se configura já que as proteínas correspondentes aos spots selecionados podem ser identificadas.

A maioria das proteínas, na sua forma íntegra, é muito grande para ser corretamente identificada pela espectrometria de massa e por isso as mesmas precisam ser submetidos a uma digestão enzimática, geralmente feita com tripsina. Cada proteína tem uma sequência específica de aminoácidos e quando uma protease de ação conhecida atua sobre determinada

proteína, peptídeos são gerados, cada um com uma sequência e uma massa específica. Esta mesma protease quando atua em outra proteína, também gera peptídeos, mas com massas e sequências distintas da primeira. Diante das possíveis combinações de aminoácidos, peptídeos distintos são gerados após a ação da protease usada, gerando uma “impressão digital das massas de peptídeos” (*peptide-mass finger printing - PMF*) para cada proteína (MANN; HOJRUP; ROEPSTORFF, 1993; THIEDE et al., 2005). De uma maneira geral, a MS é uma técnica que mede a relação entre a massa e a carga (m/z) de moléculas ionizadas em fase gasosa através de um espectrômetro de massas, que pode ser considerado uma “balança molecular”, cuja finalidade é medir a massa de átomos e moléculas com extrema precisão (DASS, 2007).

Desse modo, considerando-se que o F pode interferir na secreção e degradação de proteínas da matriz do esmalte e que fatores genéticos parecem influenciar no desenvolvimento da fluorose dentária, estudos que visam a identificar a expressão protéica neste processo patológico poderão contribuir para a elucidação de sua patogênese. A utilização de camundongos susceptíveis ou resistentes à fluorose dentária, expostos a diferentes concentrações de F, parece ser o modelo ideal para que estes eventos moleculares possam ser estudados, através de ferramentas proteômicas de ponta.

Proposição

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar os mecanismos moleculares envolvidos na susceptibilidade genética aos efeitos do F na matriz do esmalte nos estágios de secreção e maturação, em camundongos susceptíveis (A/J) e resistentes (129P3/J) à fluorose dentária, após administração de água suplementada com 0 (controle) e 50 mg/L de F por 6 semanas.

Os objetivos específicos foram:

- Quantificar a concentração de F no plasma dos animais;
- Quantificar a concentração de F incorporado no esmalte dentário dos animais;
- Identificar e quantificar relativamente as proteínas com abundância diferencial nos estágios de secreção e maturação do esmalte, entre as diferentes linhagens da camundongos, submetidos aos mesmos tratamentos, bem como entre os diferentes tratamentos dentro da mesma linhagem.

Material & Métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO DOS ANIMAIS E TRATAMENTO COM F

Este projeto foi submetido à aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo (FOB-USP), tendo sido aprovado (Proc. 08/2011) (Anexo A).

Para o presente estudo foram utilizados camundongos de ambos os gêneros, com número igual de machos e fêmeas representantes das linhagens 129P3/J e A/J, após o desmame (21 dias). Os animais da linhagem 129P3/J foram adquiridos do *Jackson Laboratory* (Bar Harbor, ME), uma vez que esta linhagem não era disponível no Brasil. Já os animais da linhagem A/J foram importados também do *Jackson Laboratory* e a terceira geração foi utilizada na pesquisa. A razão da seleção destas duas linhagens é baseada no fato de que a linhagem de camundongos A/J é altamente susceptível à fluorose dentária, apresentando um rápido e severo desenvolvimento da doença quando o animal é exposto ao F, enquanto que a linhagem 129P3/J é menos afetada, com baixo índice de fluorose dentária (EVERETT et al., 2002). Em adição, as diferenças fenotípicas e genéticas entre os animais, bem como sua disponibilidade geral como linhagens de laboratório normais (*wild type*), também contribuíram para a sua seleção. Após cada processo de importação, os animais foram acondicionados em uma sala devidamente climatizada no Biotério Central da FOB-USP onde permaneceram em caixas plásticas (n=5 por caixa) por um período de 30 dias para adaptação ao novo ambiente e eliminar eventual estresse decorrente da viagem. A temperatura e a umidade no ambiente foram controladas ($23\pm1^{\circ}\text{C}$ e 40-80%, respectivamente) com um ciclo de claro/escuro de 12 h. Os animais tiveram livre acesso a uma dieta semi-purificada de baixa concentração de F([F]) (cerca de 1 mg/L de F) (AIN 76, PMI Nutrition, Richmond, IN, EUA).

Durante o período experimental, parte dos camundongos permaneceram em gaiolas metabólicas plásticas (figura 2), em duplas, e separados por gênero, para que fosse possível controlar a quantidade de F ingerida, assegurando que a quantidade de F ingerida pelos animais das duas linhagens fosse semelhante. O restante dos animais permaneceram em caixas plásticas (n=5 por caixa). Um estudo metabólico realizado por Carvalho et al. (CARVALHO

et al., 2009) revelou que os camundongos da linhagem “susceptível” A/J ingerem um volume de água (independentemente da concentração de F nessa água) cerca de 30-40% maior que aquele ingerido pela linhagem “resistente” 129P3/J. Assim, as concentrações de F na água foram ajustadas semanalmente para garantir que animais de ambas as linhagens tivessem exposições ao F similares. É importante ressaltar que as gaiolas metabólicas são equipadas com copos secundários para a coleta da água e da ração desperdiçada, com um aumento da exatidão dos dados da ingestão. A temperatura e a umidade foram também controladas, como descrito anteriormente.

Figura 2 - Gaiolas metabólicas que foram utilizadas para o controle do consumo de ração e água administradas aos camundongos. Durante o período experimental, os animais permaneceram em pares e separados por gênero.

Dois níveis de tratamento com F (como NaF) foram administrados *ad libitum* através da água de beber, por 6 semanas. Os animais receberam 0 (controle) e 50 mg/L de F, iniciando aos 80 dias de vida. Selecionou-se a dose de 50 mg/L de F por ser a concentração de F na água de beber para se obter [F] no soro dos camundongos equivalente a $\approx 8 \mu\text{mol/L}$ de F

($\approx 0,150$ mg/L de F), que é a concentração esperada no plasma de indivíduos que residem em áreas de fluorose endêmica (aproximadamente 10 mg/L F na água). Tem sido relatado que é necessário administrar água com concentração de F cerca de 5 vezes maior para roedores, a fim de se atingir níveis plasmáticos de F similares àqueles que são observados em humanos (DUNIPACE et al., 1995). Anteriormente aos 80 dias de vida, os animais receberam água deionizada.

As amostras de água deionizada e preparada com F foram periodicamente analisadas para este elemento com propósito de controle de qualidade. Cada grupo de tratamento com F consistiu de 200 animais (100 da linhagem A/J e 100 da linhagem 129P3/J), totalizando 400 animais. O grupo 1 recebeu água deionizada, e o grupo 2, água deionizada suplementada com 50 mg/L de F, por 6 semanas. Vale ressaltar que, como a linhagem A/J ingere uma quantidade significativamente maior de água quando comparada com a linhagem 129P3/J, optou-se por diminuir a [F] na água fornecida à linhagem A/J, a fim de que todos os animais tivessem ingestão de F semelhante. Para isto, foi considerada a média de ingestão de água dos animais da linhagem A/J, bem como a média dos animais da linhagem 129P3/J. A partir da média ingerida pelas duas linhagens foi calculada a razão entre elas para definir qual a [F] presente na água fornecida aos animais da linhagem A/J, a fim de que a quantidade de F ingerida por eles fosse similar àquela ingerida pelos animais da linhagem 129P3/J.

4.2 EUTANÁSIA DOS ANIMAIS E COLETA DAS AMOSTRAS

Ao término do período experimental, os animais foram anestesiados com uma mistura de ketamina (Dopalen-Vetbrands) e xilazina (Anasedan-Vetbrands) conforme o peso, de acordo com a indicação do fabricante. A cavidade peritoneal e depois a torácica foram expostas, o coração foi puncionado com agulha, o sangue foi coletado com uma seringa plástica heparinizada (uma gota de Heparina contendo 5.000 UI/mL), e transferido para tubos plásticos (tipo *Eppendorf*), homogeneizado e posteriormente centrifugado a 3500 rpm por 10 minutos (Jouan A14) a 4°C a fim de se obter o plasma, que foi imediatamente congelado a -80°C.

Na sequência, as mandíbulas e as maxilas foram coletadas e lavadas com tampão gelado (Tris 100 mM, EDTA 1 mM, PMSF 1 mM, pH 7,4) e congeladas imediatamente a -80°C (figura 3). Posteriormente, os incisivos foram extraídos, dissecados cuidadosamente, lavados em tampão gelado e deixados secar por aproximadamente 3 minutos à temperatura

ambiente, até que uma região opaca estivesse visível. Essa região permitiu distinguir os estágios de secreção e maturação do esmalte (PORTO et al., 2006) Com auxílio de um bisturi, foi realizada uma raspagem da matriz do esmalte nos estágios de secreção e maturação (≈ 15 mg de pó de matriz de esmalte, o que correspondeu, em média a 20 dentes) em tubos de 1,5 mL previamente pesados e identificados. Após este procedimento, os tubos contendo a matriz do esmalte foram armazenados a -80°C .

Figura 3 - Mandíbulas/Incisivos extraída(o)s dos camundongos das linhagens A/J (esquerda) e 129P3/J (direita).

4.3 DOSAGEM DE FNO PLASMA

Para a análise do F no plasma foi feita uma pré-difusão, pois, por se tratar de um fluido biológico, o plasma contém CO_2 que deverá ser eliminado. Para tanto, a amostra de plasma foi colocada em placa de Petri (Falcon 1007) e sobre ela foi colocado o ácido sulfúrico saturado (HMDS) num volume que corresponde a 20% do volume da amostra de plasma. Este ácido sulfúrico (chamado de ácido aquecido) foi previamente aquecido até que o seu volume fosse reduzido pela metade, a fim de eliminar qualquer F residual que possa contaminar a amostra. Após a adição do ácido aquecido, as placas foram deixadas abertas por 15 min para a saída do CO_2 , o volume das mesmas foi completado para 2 mL com água deionizada e então a difusão seguiu como descrito por Taves (1968) e modificado por Whitford (1996). Na tampa destas placas, foram colocados 50 μL de NaOH 0,05 M, distribuídos em 5 gotas. As placas foram então fechadas, seladas com vaselina, e por um orifício feito previamente na tampa foi

colocado HMDS (hexametil-disiloxano) (Aldrich, 2,0 mL em ácido sulfúrico 3 M). O orifício foi imediatamente selado com vaselina e parafilme. As placas foram colocadas então numa mesa agitadora orbital plana (Nova Técnica, modelo NT 145) em velocidade 2-3, durante a noite.

No dia seguinte, as tampas foram removidas, invertidas e as gotas de NaOH foram combinadas numa única gota. O NaOH foi tamponado pela adição de 25 μL de ácido acético 0,2 M. O volume total foi então ajustado para 75 μL com água deionizada, usando uma pipeta. A gota, contendo todo o F foi analisada com o eletrodo Orion 9409 e um micro-eletrodo de referência calomelano (Accumet, número de catálogo #13-620-79), ambos acoplados ao potenciômetro Orion EA 940. Durante a leitura, os dois eletrodos foram mantidos unidos através de bandas de borracha e colocados em contato com a gota na parte interna da tampa da placa (figura 4).

A técnica de difusão facilitada por HMDS apresenta as vantagens de separar o F da amostra, eliminando interferentes, e ao mesmo tempo concentrá-la, o que incrementa o limite de detecção do F pelo eletrodo sensível, que é de 0,02 $\mu\text{g/mL}$, conforme consta no manual do fabricante. Uma vez que nossa amostra tem um volume final de 0,075 mL, após a difusão facilitada por HMDS, podemos detectar quantidades de F acima de 0,0015 μg . Considerando que os níveis de F plasmáticos geralmente giram em torno de 0,5-1,0 $\mu\text{mol/L}$ (0,0095-0,019 $\mu\text{g/mL}$), utilizando-se 1 mL de plasma para análise (antes da difusão facilitada por HMDS) teríamos uma quantidade de F de 0,0095-0,019 μg , portanto, bem acima do limite de detecção do eletrodo.

Para validação da análise de F, as soluções-padrão (contendo 0,0095, 0,019, 0,095 e 0,19 μg F) empregadas na realização da curva de calibração foram preparadas por diluição seriada de um estoque-padrão contendo 0,1 M F (Orion) e difundidas em triplicata, em concomitância com as amostras de plasma a serem analisadas. Foi feita a primeira leitura antes de se começar a ler as amostras de plasma, a segunda quando a metade das amostras já tiver sido lida e a terceira após o término da leitura das amostras. As leituras obtidas em milivoltagem (mV) foram convertidas para μg de F, através do Programa Excel (Microsoft). A média das leituras obtidas a partir dos padrões foi inserida na planilha, e então foi calculada a porcentagem de variação entre a quantidade de F medida e a esperada pelos padrões. Somente curvas de calibração com porcentagem de variação de até 5% para todos os padrões e $r \geq 0,99$ foram aceitas, contemplando a exatidão do método.

Além disso, padrões que não sofreram difusão foram preparados usando-se as mesmas soluções (NaOH 0,05 M e ácido acético 0,20 M) que foram usadas para preparar os padrões e amostras que sofreram difusão. Estes padrões não difundidos foram feitos de modo a ter exatamente a mesma concentração de F que os padrões que sofreram difusão. A comparação das leituras de mV mostrou que o F nos padrões difundidos foi completamente captado e analisado.

Foi feita também uma sequência de padrões que sofreram adição do ácido aquecido de maneira que as amostras e as leituras de mV foram as mesmas tanto para os padrões que não sofreram adição de ácido aquecido, quanto para aqueles que sofreram, assim como também para os que não sofreram difusão.

Figura 4 – As placas de Petri foram vaselinadas e em seguida as amostras foram adicionadas (a). Adição de 2 mL de água deionizada e 50 μ L de NaOH 0,05 M na tampa da placa de Petri (b). Fechamento das placas e adição de 2 mL de HMDS (c). Leitura das amostras com um Eletrodo Orion 9409 e um micro eletrodo calomelano de referência para leitura de F (d).

4.4 DOSAGEM DE F INCORPORADO NO ESMALTE DOS INCISIVOS

Para determinação do F incorporado no esmalte dos incisivos, foi realizado previamente o preparo de todos os dentes. Foram selecionados aleatoriamente 30 dentes incisivos de cada linhagem (n=60), sendo 15 deles pertencentes ao grupo controle e 15 ao grupo que recebeu 50 mg/L de F. Inicialmente, foi realizada a limpeza de todos os dentes com jatos de água deionizada para remoção de qualquer tecido sobre a superfície do dente. Após a limpeza, foi realizada a extirpação da polpa dentária com limas Odontológicas tipo Kerr.

Todos os dentes foram armazenados em tubos para microcentrifuga de 1,5 mL, individualmente, e com as tampas abertas para posterior colocação em estufa a 37°C para eliminação de toda água presente no mesmo. Previamente à colocação dos dentes na estufa, todos foram pré-pesados para acompanhamento da desidratação dos dentes ao longo de dois dias e estabilização do peso (mg) de todos os dentes (figura 5).

Figura 5 - Preparo inicial dos incisivos. Inicialmente os dentes foram dissecados da mandíbula e lavados com água deionizada. Em seguida, a polpa foi removida e os mesmos foram novamente lavados e deixados em estufa para completa desidratação.

Sobre a superfície do dente já limpo e seco, foi colocado um pedaço circular de fita adesiva (fita mágica, 3M) com área de 3,14 mm² para isolar a área onde foi feita a biópsia e o restante foi isolado com esmalte de unhas e o canal da polpa protegido com cera utilidade rosa. Após a secagem do esmalte, a fita adesiva foi removida, estando a área pronta para sofrer biópsia (figura 6).

Figura 6 - Preparo dos dentes para biópsia. Inicialmente a fita foi colocada sob a superfície do dente e em seguida o restante da superfície foi isolado com esmalte de unha. Após a secagem do esmalte, a fita foi removida e a área ficou pronta para realização da biópsia.

Para realização das biópsias, os dentes foram imersos em 0,25 mL de HCl 0,5 M por 15 segundos (BEZERRA DE MENEZES et al., 2003), sob agitação. O extrato ácido assim obtido foi imediatamente neutralizado, após os 15 segundos, com 0,25 mL de TISAB II pH 5,0 e submetido à análise de F pelo método direto, utilizando-se o eletrodo F-sensível (Orion Research, Cambridge, Mass, EUA, modelo 9609BN) acoplado a um potenciômetro (Procyon, modelo SA 720). Previamente à leitura das amostras, o eletrodo foi calibrado com padrões contendo concentrações de F variando entre 0,05 e 6,4 mg/L. As leituras, obtidas em mV, foram convertidas para μg de F, através do Programa Excel (Microsoft). A média das leituras obtidas a partir dos padrões foi inserida na planilha, e então foi calculada a porcentagem de variação entre a quantidade de F medida e a esperada pelos padrões. Somente curvas de calibração com porcentagem de variação de até 5% para todos os padrões foram aceitas.

Após a análise do F, a amostra foi submetida à análise de fósforo (FISKE-SUBARROW, 1925) para que se pudesse calcular a concentração de F em ppm (mgF/kg esmalte). Para este cálculo, considerou-se que o esmalte de camundongos tem 13,8% de fósforo (WHITFORD, 1991).

4.4.1 Determinação do fósforo liberado pelo esmalte

O fósforo liberado no sobrenadante foi determinado colorimetricamente pelo método de Fiske e Subarrow (1925) utilizando-se um espectrofotômetro digital (Cary 50). A reação foi feita de acordo com o quadro 1, e para o preparo dos padrões foram empregados os seguintes reagentes:

1. Reativo Redutor

Acido alfa amino naftol sulfônico (AANS): 0,2 g

Sulfeto de sódio: 1,2 g

Dissulfito de sódio: 1,2 g

A mistura foi triturada em gral e armazenada em frasco escuro. Na hora da análise, cada 0,025 g da mistura foram dissolvidos em 1,0 mL de água deionizada.

2. Acido Molibdico

Molibdato de amônio: 6,25 g

Acido sulfúrico concentrado: 27,0 mL

3. Padrão contendo 3 mg% P (a partir de fosfato de potássio)

Quadro 1. Padrões que foram utilizados na dosagem de fósforo.

	Blank	Padrão 1	Padrão 2	Padrão 3	Padrão 4	Padrão 5	Amostra
Água deionizada	2,3 ml	2,275 ml	2,25 ml	2,2 ml	2,1 ml	1,9 ml	2,2 ml
Padrão P 3 mg %	-	0,025 ml	0,05 ml	0,1 ml	0,2 ml	0,4 ml	-
Amostra	-	-	-	-	-	-	-
Ácido Molibdico	0,5 ml em todos, agitar e esperar 10 minutos.						
Redutor	0,2 ml em todos, agitar imediatamente, esperar 20 minutos e ler						
D.O 660 nm							
µgP/ml	0	0,75	1,50	3,00	6,00	12,00	

Inicialmente foi colocada água deionizada nos tubos de ensaio, de acordo com os volumes descritos no Quadro 1. A seguir foram colocados os padrões ou as amostras. Então foi colocado 0,5 mL de ácido molibdico em todos os tubos, feita a agitação e esperou-se 10 minutos. A coloração da reação foi desenvolvida pela adição de 0,2 mL de reativo redutor. Após 20 minutos da adição do reativo redutor, foi realizada a leitura em espectrofotômetro (Cary 50, Pharmacia) a 660 nm de absorbância.

4.5 DOSAGEM DE F NA ÁGUA DE BEBER

A concentração de F presente na água administrada aos camundongos foi determinada em duplicata, usando-se o eletrodo Orion 9609 após serem tamponadas com um volume idêntico de TISAB II (Tampão de ajuste da força iônica total), contendo CDTA (ácido cilcohexano diamino tetracético) 0,4%, pH 5,0.

4.6 ANÁLISE PROTEÔMICA

4.6.1 Extração das proteínas da matriz do esmalte dos camundongos

Para a extração das proteínas da matriz do esmalte, as mandíbulas e as maxilas foram coletadas e lavadas com tampão PBS gelado pH 7,4 contendo inibidor de protease *Complete EDTA-Free* (Roche) e congeladas imediatamente a -80°C . Posteriormente, os incisivos foram extraídos, dissecados cuidadosamente, lavados em tampão PBS gelado e a polpa removida com auxílio de uma lima odontológica para evitar possível contaminação. Em seguida, os dentes foram deixados secar por aproximadamente 3 min à temperatura ambiente, até que uma região opaca estivesse visível. Essa região permite distinguir as estágios de secreção e maturação do esmalte (PORTO et al., 2006). Com auxílio de um bisturi, foi realizada uma raspagem da matriz do esmalte nos estágios de secreção e maturação em tubos de 1,5 mL previamente pesados e identificados. Após este procedimento, os tubos contendo a matriz do esmalte foram pesados para a padronização da quantidade de matriz obtida e em seguida armazenados a -80°C .

Foram pesados 15 mg de pó da matriz do esmalte, aos quais foi adicionado 1 mL de tampão de lise contendo uréia 7 M, tiouréia 2 M, CHAPS 4 %, DTT 1 %, anfólitos carregadores 0,5 % pH 3-10 e um coquetel de inibidores de proteases. As amostras foram então deixadas sob agitação em vórtex por 12 h a 4°C , e após este período, o homogenato foi centrifugado a $8.000 \times g$ por 10 min a 4°C (Eppendorf, R5409) e o sobrenadante coletado. Este processo foi repetido por mais uma vez. Para melhorar a limpeza das amostras, utilizou-se o *kit PlusOne 2D Clean-up* (GE Healthcare, Uppsala, Suécia), que contém agentes precipitantes e coprecipitantes que auxiliam na remoção dos contaminantes presentes na amostras, resultando em géis mais limpos. Deste modo, 200 μL de amostra foram processados de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante. Após a precipitação e limpeza das amostras, o *pellet* obtido foi ressuspensão em 200 μL de solução de contendo uréia 7 M, tiouréia 2 M, CHAPS 2 %, anfólito carreador pH 3-10 0,5 % e 0,002 % de azul de bromofenol (GE – HEALTHCARE, 2004). Empregou-se o *PlusOne 2D Quantification Kit* (GE Healthcare) para avaliar a quantidade de proteínas totais obtidas em cada processo de extração e estipular a quantidade de proteínas a ser utilizada nos experimentos subsequentes. Este método de quantificação é compatível com os reagentes nas concentrações usadas para ressuspender as proteínas do esmalte.

Antes de se iniciar o ensaio, preparou-se um volume apropriado de reagente (*working colour reagent*), misturando 100 partes do reagente A com 1 parte do reagente B. Preparou-se

uma curva padrão usando 2 mg/mL de albumina do soro bovino (BSA), da solução padrão fornecida pelo kit.

Foram preparados para o ensaio tubos contendo 2 e 3 µL das amostras da matriz do esmalte, em triplicata. Foram adicionados 500 µL do precipitante em cada tubo (incluindo os tubos da curva padrão). Agitou-se brevemente no vórtex e incubaram-se os tubos 2-3 minutos em temperatura ambiente. Foram adicionados 500 µL de co-precipitante em cada tubo e misturou-se brevemente no vórtex. Os tubos foram centrifugados a 10000 x g por 5 min, para sedimentar a proteína. O sobrenadante foi removido e os tubos reposicionados na centrífuga, na mesma posição inicial, com o *pellet* voltado para fora. Centrifugou-se novamente os tubos para trazer qualquer líquido remanescente para a parte superior do tubo, por 1 min, e o sobrenadante remanescente foi removido por pipetagem. Adicionaram-se 400 µL de água deionizada em cada tubo. Agitou-se com o vórtex brevemente para dissolver a proteína precipitada. A cada 30 segundos, adicionaram-se 100 µL de solução de cobre e 1 mL de *working colour* reagente para cada tubo e agitou-se no vórtex. Todos os tubos foram incubados em temperatura ambiente por 20 min. Após esse período de incubação, a absorbância de cada amostra e do padrão foi lida a 480 nm, usando água como referência. Diferente da maioria dos ensaios de proteínas, a absorbância da solução de ensaio decresce com o aumento da concentração de proteína. Foi criada uma curva padrão, colocando a absorbância dos padrões contra a quantidade de proteínas.

4.6.2 Primeira Dimensão - Focalização Isoelétrica

O volume calculado para cada amostra de matriz do esmalte, com base no teste de quantificação de proteína, correspondeu ao volume da amostra contendo 500 µg de proteína (quantidade de proteína em 300 µL de amostra + tampão). Na primeira dimensão foi aplicado um volume de 250 µL, contendo 500 µg de proteínas do esmalte.

As proteínas foram primeiramente separadas de acordo com seu ponto isoelétrico (pI), através de focalização isoelétrica (IEF), utilizando o sistema *Ettan IPGphor 3* (GE Healthcare, Uppsala, Suécia). A caracterização das proteínas presentes na amostra foi realizada com tiras IPG de 13 cm e gradiente de pH 3-10. As fitas IPG foram reidratadas durante 15 h a 20 °C em 250 µL de solução de reidratação contendo as proteínas. Sobre as fitas IPG acrescentaram-se 3 mL de óleo mineral (*cover Fluid*, GE Healthcare, Uppsala, Suécia) para evitar evaporação dos reagentes durante o processo de reidratação. A focalização isoelétrica foi realizada nas seguintes condições: 300 V por 1 h, 1.000 V por 1 h e, por fim, 5.000 V (figura 7).

Figura 7 - Focalização Isoelétrica no Ettan IPGphor 3 (GE Healthcare).

4.6.3 Segunda Dimensão – SDS-PAGE

Após a focalização, as tiras foram removidas do *strip holder*, lavadas com água deionizada e equilibradas em uma solução tampão de equilíbrio contendo 1 % (p/v) DTT por 15 min e, em seguida, para alquilação, no mesmo tampão contendo 2,5 % (p/v) de iodoacetamida (IAA) por 15 min adicionais.

A eletroforese de segunda dimensão foi realizada em gel vertical com gradiente de 5-20% de acrilamida (200 mm X 250 mm X 1mm) no sistema SE 600 Ruby (Ge Healthcare). Depois de equilibradas, as tiras foram inseridas sobre o gel de acrilamida e fixadas com uma solução pré-aquecida de 0,5% (p/v) de agarose solubilizada em tampão de corrida *Laemmli* (LAEMMLI, 1970). A corrida foi realizada em duas fases, onde, na primeira fase utilizou-se uma corrente fixa de 90 V, 20 mA/gel e 100 W por 20 min, para migração das proteínas da tira IPG para o gel. Já na segunda fase, a corrida foi conduzida com corrente constante de 120 V, 40 mA/gel e 100 W a 20°C, até que o azul de bromofenol atingisse o fundo do gel (aproximadamente 4 h) (figura 8).

Ao todo, foram realizadas 6 corridas, sendo 3 para o estágio de secreção e outras 3 para o estágio de maturação do esmalte. Após cada uma das corridas foram obtidos 4 géis, sendo um para cada linhagem (A/J e 129P3/J) e tratamento [0 ppm F (C) e 50 ppm F (T)], totalizando 24 géis, ou seja, uma triplicata para cada condição.

Figura 8- Segunda dimensão em géis SDS-PAGE de 5-20% de acrilamida (200 mm X 250 mm X 1mm) no sistema SE 600 Ruby (GE Healthcare).

4.6.4 Visualização e análise de imagens da eletroforese bidimensional

As proteínas separadas por 2DE foram visualizadas através da coloração por *Coomassie Brilliant Blue G-250* (USB, Cleveland, OH, EUA), realizada de acordo com o protocolo de Candiano e colaboradores (CANDIANO; BRUSCHI; MUSANTE et al., 2004). Para isso, ao fim da corrida, o gel foi colocado em solução fixadora contendo ácido fosfórico 1,3 % e metanol 20 % durante 1 h, para prevenir a mobilidade das proteínas no gel e lavar os anfólitos. Então, os mesmos foram lavados com água deionizada e deixados por 24 h em solução de coloração contendo 10 % de ácido fosfórico, 10 % de sulfato de amônio, 0,12 % de *Coomassie Brilliant Blue G-250* e 20 % de metanol. Por fim, os géis foram lavados com água deionizada e armazenados em solução de ácido acético 7 %. Os géis corados foram digitalizados com resolução de 300 dpi com auxílio do programa *LabScan 6.0* (GE Healthcare, Uppsala, Suécia) no *ImageScanner™ III* (GE Healthcare, Uppsala, Suécia). Para a análise das imagens, foi adotado o programa *ImageMaster 2D Platinum 7.0* (GE Healthcare, Uppsala, Suécia).

A detecção dos *spots* e a determinação do seu volume foram realizadas de modo automático, adotando-se os seguintes parâmetros: *smooth* = 4, área mínima = 4 e *saliência* = 110. Dentro de cada grupo, o gel com o maior número de *spots* foi escolhido como gel de referência e em seguida foi efetuado o *match gels*, uma comparação entre os *spots* das réplicas de cada grupo. Após esse passo, foram realizadas correções com a adição e remoção manual dos *spots*. Com as correções devidamente efetuadas, procedeu-se à análise das classes, que forneceu a diferença estatística entre os grupos experimentais.

Pelo programa também foram estimados os pontos isoeletricos e as massas moleculares de cada *spot*. Para determinar diferenças na expressão protéica, foram consideradas as alterações no valor de % de volume. O uso da % de volume implica na normalização do *spot*, pois para calcular a % de volume, considera-se o volume total de todos os *spots* no gel. Assim, minimizam-se as variações decorrentes da quantidade de proteína aplicada e do procedimento de coloração.

4.6.5 Preparo das amostras para espectrometria de massas

Após análise pelo *software*, os *spots* de interesse foram excisados dos géis e preparados para espectrometria de massas (SHEVCHENKO et al., 2006). Para isso, duas folhas brancas de EVA foram coladas sobre uma bancada com boa iluminação, e em cima destas, foram posicionadas três placas de vidro. As triplicatas de cada grupo foram então posicionadas sobre cada placa e com o auxílio de ponteiras universais de 1000 μL e 200 μL , das quais as pontas foram retiradas em diferentes alturas para proporcionar diferentes diâmetros, os *spots* foram excisados (figura 9). As peças excisadas foram cortadas em segmentos de aproximadamente 1 mm^3 , transferidas para tubos de 2,0 mL contendo 200 μL de ácido acético 5 % e armazenadas a 4°C até o passo seguinte.

Figura 9- Excisão e recorte dos *spots* selecionados para espectrometria de massa. Os *spots* provenientes dos 3 géis obtidos para cada grupo são inicialmente captados com uma ponteira plástica. Depois, são cortados em fragmentos de cerca 1 mm^3 com lâmina de bisturi.

Para a remoção do corante, os segmentos de gel foram lavados no mínimo por três vezes, em uma solução contendo acetonitrila (ACN) 50% (v/v) e bicarbonato de amônio (AMBIC) 25 mM por 30 min, pois os géis deveriam estar totalmente transparentes para passar ao próximo passo. Posteriormente, os mesmos foram desidratados duas vezes em ACN 100 % por 10 min. Ao final da segunda desidratação, a ACN foi removida e o resíduo remanescente deixado evaporar em temperatura ambiente.

Depois de desidratados, os *spots* foram submetidos à redução e alquilação. Para isso, foram inicialmente reidratados com DTT 20 mM em AMBIC 50 mM e incubados por 40 min a 56 °C. O excesso de líquido foi removido e substituído por IAA 55 mM em AMBIC 50 mM. Após 30 min no escuro, em temperatura ambiente, o líquido foi removido, os fragmentos foram lavados em AMBIC 25 mM e em seguida desidratados em ACN 100%. A ACN foi descartada e o resíduo remanescente no gel foi deixado evaporar em temperatura ambiente.

Para a digestão das proteínas, os fragmentos de gel foram reidratados com 15 µL de solução contendo 150 ng de tripsina (*Trypsin Gold Mass Spectrometry*, Promega, Madison, WI, EUA) em AMBIC 25 mM por 15 min para que a tripsina pudesse penetrar no gel. Em seguida, adicionaram-se 50 µL de AMBIC 25 mM para total cobertura dos *spots* e incubou-se a 37 °C por 14 h. Ao fim de 14 h, a ação da tripsina foi interrompida pela adição de 15 µL de solução bloqueadora (ACN 50% v/v e ácido fórmico 5% v/v). Os peptídeos foram eluídos da acrilamida com duas lavagens de 15 min com solução de eluição A (ACN 50% v/v e ácido fórmico 1% v/v), uma lavagem de 15 min com solução de eluição B (metanol 60% v/v e ácido fórmico 1% v/v) e mais duas lavagens com ACN 100%, a 45 °C sob sonicação. O aparelho de sonicação usado foi um ULTRA-SOM de banho (Branson, modelo 2510, Danbury, CT, EUA) com 40 KHz de frequência fixa e potência de 30 W. A solução contendo os peptídeos extraídos foi submetida a secagem em um concentrador a vácuo (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) à temperatura ambiente, por 2-3 h e então o tubo foi armazenado a -20 °C até a realização do sequenciamento.

4.6.6 Espectrometria de massas (LC-ESI-MS/MS)

O sequenciamento das proteínas de interesse foi realizado na plataforma LC-MS/MS NanoAcquity Ultra Performance LC (Waters, Milford, MA, EUA), acoplado a uma fonte *nanoelectrospray* no espectrômetro de massas Q-TOF Ultima (Waters, Milford, MA, EUA), disponível para uso multiusuários no Laboratório Nacional de Biociências (LNBio), em Campinas, SP.

Para tanto, os peptídeos foram solubilizados em 4,5 µL de ácido fórmico a 0,1%, transferidos para os tubos específicos e levados ao equipamento. Uma alíquota de 2,0 µL da mistura de peptídeos resultante foi separada por uma coluna C18 (100 µm x 100 mm) no *nanoAcquity* a um fluxo de 0,6 mL/min. O gradiente foi 2-90% de acetonitrila em ácido fórmico 0,1% por 10 min. O equipamento foi operado no modo “*top three*”, no qual é obtido um espectro de massa seguido por MS/MS dos 3 picos mais intensos detectados. Os espectros foram adquiridos usando o *software MassLynx v.4.1* e os arquivos brutos foram convertidos para o formato mgf através do *software Mascot Distiller v.2.3.2.0*, 2009 (Matrix Science Ltd.) e submetidos à base de dados *Mouse International Protein Database (IPI)* v. 3.73 (release 2010, June; 39711 sequences; 21109946 residues) usando a ferramenta de busca *MASCOT v.2.3.01* (Matrix Science Ltd.), tendo como modificação fixa a carbamidometilação e modificação variável a oxidação da metionina, um resíduo perdido da clivagem por tripsina e tolerância de 0,1 KDa, tanto para os resíduos precursores quanto para os resíduos já fragmentados (figura 10). O princípio da análise é a comparação dos espectros dos peptídeos com as sequências de aminoácidos de proteínas que estão relacionadas em bancos de dados.

Foram consideradas positivas as identificações onde pelo menos três peptídeos eram encontrados e na maioria das vezes as identificações eram confirmadas com dados de MS/MS para pelo menos um peptídeo por proteína. Em ambos os casos, os valores de *ion score* (mínimo de 34), e a acurácia entre os valores de massa molecular e pI experimental e teórico de cada *spot* eram levados em consideração como valores estatísticos para identificação. As identificações também levaram em conta a relação entre o organismo, no qual as proteínas foram identificadas e o organismo estudado.

MASCOT MS/MS Ions Search

Your name: Senda Charone Email: sendacharone@yahoo.com.br

Search title: Enamel proteins

Database(s): Vertebrates_EST, Rodents_EST, Prokaryotes_EST, Plants_EST, Mus_EST

Enzyme: Trypsin

Allow up to: 1 missed cleavages

Quantitation: None

Taxonomy: Mus musculus (house mouse)

Fixed modifications: Carbamidomethyl (C)

Variable modifications: Oxidation (M)

Peptide tol. ±: 0.1 Da # ¹³C: 0 MS/MS tol. ±: 0.1 Da

Peptide charge: 2+ and 3+ Monoisotopic: ☐ Average: ☒

Data file: Escolher arquivo Nenhum arquivo selecionado

Data format: Micromass (.PKL) Precursor: m/z

Instrument: ESI-QUAD-TOF Error tolerant: ☐

Decoy: ☐ Report top: AUTO hits

Start Search ... Reset Form

©2013 Matrix Science | Links | Site map | Terms of use | Design: Gibson

Figura 10 - Seleção dos parâmetros de busca de íons MS/MS na base MASCOT.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os softwares *GraphPad InStat* versão 3,0 para Windows e *GraphPad Prism* versão 4,0 para Windows (Graph Pad Inc., La Jolla, CA, EUA) foram utilizados. Inicialmente foram checadas a normalidade (teste de *Kolmogorov* e *Smirnov*) e a homogeneidade (teste de *Bartlett*) dos dados, para seleção do teste estatístico apropriado. Para o peso inicial e final, consumo de água e concentração de F nos incisivos, estando estes critérios satisfeitos, os dados foram analisados por ANOVA a 2 critérios, seguida do teste de *Bonferroni* para comparações individuais. Já para a concentração de F no plasma, os dados apresentaram distribuição normal, mas as diferenças entre os desvios-padrão foram significativas. Foram então analisados por ANOVA a 2 critérios, após transformação logarítmica.

Para verificar a existência de diferença significativa entre os *spots* das diferentes linhagens foi realizado o teste de ANOVA, disponível no software *ImageMaster 2D platinum* v.7 (GE Healthcare), com nível de significância de 5%.

Resultados & Discussão

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 TRATAMENTO DOS ANIMAIS E DOSAGEM DE F

A fluorose dentária constitui-se em um distúrbio do desenvolvimento com etiologia bem definida e patologia controversa (BRONCKERS; LYARUU; DENBESTEN, 2009; DENBESTEN; LI, 2011; ROBINSON et al., 2004; WHITFORD, 1996). Ao procurar entender o motivo pelo qual a exposição excessiva ao F provoca modificações no esmalte dentário com graus variados de severidade, muitas pesquisas têm sido estabelecidas nas últimas décadas a fim de buscar, no mecanismo da mineralização e todas as suas particularidades, as respostas para o processo de desenvolvimento da fluorose (AOBA; FEJERSKOV, 2002; BRONCKERS; LYARUU; DENBESTEN, 2009; BROWNE; WHELTON; O'MULLANE, 2005; BUZALAF; WHITFORD, 2011; DENBESTEN; LI, 2011; DENBESTEN; HEFFERNAN, 1989; DENBESTEN et al., 2002; RICHARDS; FEJERSKOV; BAEUM, 1989; RICHARDS et al., 1986; ROBINSON et al., 2004). Houve então, a necessidade de padronização experimental da fluorose dentária, o que levou à proposição de diferentes modelos experimentais, dentre os quais os modelos utilizando roedores (BRONCKERS; LYARUU; DENBESTEN, 2009).

Estudos frequentemente têm utilizado como modelo dentes incisivos de ratos e camundongos, que erupcionam continuamente, pelo fato de todos os estágios de desenvolvimento poderem ser observados em um único dente e porque tem sido demonstrado que vários estágios de formação do esmalte exibem grande semelhança com o que ocorre nos dentes humanos (AOBA; FEJERSKOV, 2002; BRONCKERS; LYARUU; DENBESTEN, 2009; DENBESTEN; LI, 2011). Nos incisivos de roedores em contínua erupção, os vários estágios da amelogênese estão dispostos sequencialmente ao longo da extensão do dente (AOBA; FEJERSKOV, 2002; BRONCKERS; LYARUU; DENBESTEN, 2009; DENBESTEN; LI, 2011).

Até recentemente, poucos estudos têm explorado o envolvimento de fatores genéticos na resistência ou susceptibilidade ao F (CARVALHO et al., 2013; CARVALHO et al., 2009; EVERETT, 2011; EVERETT et al., 2002; EVERETT et al., 2009; EVERETT et al., 2011; HUANG et al., 2008; MOUSNY et al., 2006; MOUSNY et al., 2008; VIEIRA et al., 2005a). Estudos genéticos utilizando linhagens isogênicas (linhagens puras) de camundongos têm sido

realizados para elucidar o efeito do F no desenvolvimento do esmalte dentário, homeostase óssea e renal, dentre outros (CARVALHO et al., 2013; CARVALHO et al., 2009; CHOU et al., 2009; EVERETT et al., 2002; EVERETT et al., 2009; MOUSNY et al., 2006; MOUSNY et al., 2008; VIEIRA et al., 2005a; YAN et al., 2007). As linhagens isogênicas de camundongos são amplamente usadas em estudos genéticos devido à própria isogenicidade dentro da mesma linhagem e heterogeneidade genética entre as diferentes linhagens (EVERETT, 2011). A diversidade genética existente entre linhagens isogênicas de camundongos tem produzido fenótipos relevantes para o entendimento da saúde humana, como a susceptibilidade ao câncer, ao envelhecimento, obesidade, susceptibilidade às doenças infecciosas, arteriosclerose, desordens sanguíneas e neurossensoriais (BOGUE et al., 2007; GRUBB et al., 2009; MADDATU et al., 2012). Apesar de dentes humanos e de ratos e camundongos apresentarem diferenças quanto ao crescimento contínuo dos incisivos mandibulares e maxilares, o estudo desses incisivos tem contribuído para o entendimento de importantes processos celulares, moleculares e genéticos, mediante o controle rigoroso da odontogênese. Diante desse aspecto, a razão da seleção das duas linhagens utilizadas no presente estudo foi baseada no fato de que os camundongos apresentam incisivos em contínua erupção, favorecendo o estudo dos efeitos do F nos diferentes estágios da amelogênese, e pelo fato da linhagem de camundongos A/J ser altamente susceptível à fluorose dentária, apresentando um rápido e severo desenvolvimento da doença quando o animal é exposto ao F, enquanto a linhagem 129P3/J ser menos afetada, com baixo índice e severidade de fluorose dentária (EVERETT et al., 2002). Em adição, as diferenças fenotípicas e genéticas entre os animais, bem como sua disponibilidade geral como linhagens de laboratório normais (*wild type*), também contribuíram para a sua seleção.

5.1.1 **Peso corporal dos animais**

Como parte da coleta de dados, mensurou-se o peso corporal e o consumo de água dos animais ao longo de todo o tratamento. A figura 11 mostra o perfil do peso médio dos animais no início e final do tratamento com F. O peso corporal inicial médio ($\pm$ DP) foi $17,4 \pm 2,3$, $22,2 \pm 2,0$, $16,5 \pm 1,5$ e $21,5 \pm 2,6$ g, para os animais 129P3/J controle, A/J controle, 129P3/J tratado e A/J tratado, respectivamente. A ANOVA a 2 critérios encontrou diferenças significativas entre as linhagens ($F=200,20$, $p<0,0001$), entre os tratamentos ($F=5,44$, $p=0,021$), sem interação entre ambos ($F=0,103$, $p=0,75$). Os respectivos pesos finais foram: $20,7 \pm 1,9$, $24,2 \pm 1,5$, $20,6 \pm 1,5$ e $24,1 \pm 1,5$ g, respectivamente. A ANOVA a 2 critérios encontrou diferenças significativas entre as linhagens ($F=146,10$, $p<0,0001$), mas não entre os

tratamentos ($F=0,02$, $p=0,89$), sem interação entre ambos ($F=0,63$, $p=0,43$). Em geral, tanto para o peso inicial quanto para o final, os animais da linhagem 129P3/J tiveram um peso cerca de 20% menor quando comparados àqueles da linhagem A/J. É importante ressaltar também que para o peso final, não houve diferença entre os animais controle e tratados com F, o que é um dado importante em estudos de toxicologia. Estes resultados estão de acordo com Carvalho et al. (2009). A diferença encontrada entre os tratamentos para o peso inicial não tem significado prático, já que o tratamento ainda não tinha sido iniciado quando o peso inicial foi aferido.

Figura 11. Média do peso corporal (g) inicial e final após 6 semanas de tratamento) para os camundongos das linhagens 129P3/J e A/J em função da [F] na água de beber. Para cada peso, letras maiúsculas e minúsculas indicam diferença significativa entre as linhagens e tratamentos, respectivamente. Barras indicam desvio-padrão. $n=36$ para os grupos controle e 42 para os grupos tratados (ANOVA a 2 critérios e teste de Bonferroni, $p<0,05$).

5.1.2 Ingestão de água pelos animais

Durante a primeira semana, os animais ingeriram água deionizada a fim de monitorar as quantidades que eram ingeridas em 24 horas pelos mesmos, antes de se iniciar o tratamento com F. Com base nesses valores, foi calculada a concentração de F necessária para o tratamento da linhagem A/J, que possui a característica de ingerir mais água do que o 129P3/J (CARVALHO et al., 2009), a fim de que a quantidade de F ingerida pelos animais das diferentes linhagens fosse a mesma. A ingestão média ($\pm$ DP) de água na semana anterior ao início do ajuste da concentração de F na água foi de $10,35 \pm 3,15$ g para os camundongos da linhagem A/J, e de $7,11 \pm 3,00$ g para os animais da linhagem 129P3/J ($n=70-84$).

Uma vez iniciado o tratamento com F, a aferição do consumo de água continuou a ser feita semanalmente. A figura 12 mostra o perfil de ingestão de água durante o estudo para ambas as linhagens 129P3/J e A/J. O mesmo perfil encontrado para a semana anterior ao tratamento foi mantido ao longo das 6 semanas de tratamento. A ingestão média ($\pm$ DP) de água em todo o período foi de $6,60 \pm 1,51$, $10,19 \pm 9,97$, $6,38 \pm 1,47$ e $9,97 \pm 1,49$ g, para os animais 129P3/J controle, A/J controle, 129P3/J tratado e A/J tratado, respectivamente ($n=35-42$). A ANOVA a 2 critérios encontrou diferença significativa entre as linhagens ($F=239,6$, $p<0,0001$), mas não entre os tratamentos ($F=1,95$, $p=0,33$) nem para a interação entre ambos ($F=0,0002$, $p=0,99$).

Figura 12. Média da quantidade de água ingerida (g) em 24 h pelos animais da linhagem 129P3/J e A/J em cada uma das 6 semanas de tratamento. Os valores se referem a dados de 2 animais alojados na mesma gaiola metabólica.

Em função do consumo semanal de água, a concentração de F na água fornecida aos animais na semana seguinte foi ajustada, conforme descrito na tabela 1, de modo a garantir que os animais das duas linhagens ingerissem a mesma quantidade de F. Como houve uma tendência de ingestão maior de água pelos animais da linhagem A/J, os animais desta linhagem receberam água contendo cerca de 20 mg/L de F a menos do que os animais da linhagem 129P3/J. Este perfil de ingestão foi comprovado previamente no estudo metabólico realizado por Carvalho et al (2009) que demonstraram que os camundongos da linhagem A/J ingerem um volume de cerca de 30-40% maior de água que aquele ingerido pela linhagem 129P3/J.

Tabela 1. Concentração de F (mg/L) na água de beber fornecida semanalmente para os camundongos da linhagem A/J durante as 6 semanas de tratamento.

Semanas	Linhagem	[F] na água de beber (mg/L de F)
Semana 1	A/J	33
	129P3/J*	50
Semana 2	A/J	32
	129P3/J	50
Semana 3	A/J	32
	129P3/J	50
Semana 4	A/J	32
	129P3/J	50
Semana 5	A/J	37
	129P3/J	50
Semana 6	A/J	32
	129P3/J	50

*Para a linhagem 129P3/J a concentração de F foi mantida em 50 mg/L de F.

5.1.3 Concentração de F no plasma

Em pesquisas com animais experimentais, a severidade das lesões causadas pelo F foi associada à duração, ao modo de administração e a concentração de F empregada (AOBA; FEJERSKOV, 2002; BRONCKERS; LYARUU; DENBESTEN, 2009; BUZALAF; WHITFORD, 2011; DENBESTEN; LI, 2011; FEJERSKOV et al., 1994; FEJERSKOV;

RICHARDS; DENBESTEN, 1996). As diferenças entre as espécies não invalidam os resultados experimentais, principalmente se tais diferenças forem previsíveis e mensuráveis. Entre ratos e homens há diferenças em relação ao metabolismo do F, daí a necessidade de ingestão de doses bem mais elevadas de F para que haja distúrbios nos dentes de roedores. Um parâmetro importante que pode ser quantificado e correlacionado ao grau de injúria ocasionado pelo F, em qualquer espécie, é a concentração desse composto no plasma (RICHARDS, 1990).

Os níveis plasmáticos de F, bem como a massa corporal, o crescimento esquelético e os períodos de remodelação óssea são fatores metabólicos que podem influenciar no desencadeamento da fluorose dentária (ANGMAR-MANSSON; WHITFORD, 1982, 1984; CARVALHO et al., 2009). Estudos têm correlacionado a ocorrência de alterações na mineralização do esmalte com elevados níveis de F no sangue (ANGMAR-MANSSON; WHITFORD, 1982, 1984; BRONCKERS; LYARUU; DENBESTEN, 2009; BUZALAF; WHITFORD, 2011; WHITFORD, 1996). Autores observaram que doses agudas de F injetadas em ratos poderiam levar à fluorose no esmalte dentário, mesmo após os índices altos de F plasmáticos terem retornado aos níveis basais (ANGMAR-MANSSON; LINDH; WHITFORD, 1990). Nesse sentido, a concentração de F no plasma e nos tecidos mineralizados, em particular no esmalte dentário, tem sido usada como biomarcador da exposição ao F (ANGMAR-MANSSON; LINDH; WHITFORD, 1990; VIEIRA et al., 2005b).

Deste modo, a figura 13 mostra a concentração de F presente no plasma dos camundongos das linhagens A/J e 129P3/J, após o tratamento. A concentração média ($\pm$ DP) de F encontrada no plasma dos camundongos foi de $0,023 \pm 0,010$ e $0,019 \pm 0,007$ mg/L para os animais do grupo controle, das linhagens A/J e 129P3/J, respectivamente, e de $0,151 \pm 0,043$ e $0,252 \pm 0,060$ mg/L de F para os animais das linhagens A/J e 129P3/J, respectivamente, tratados com água contendo 50 mg/L de F. A ANOVA a 2 critérios revelou que houve diferença significativa entre os tratamentos ($F=658,0$, $p<0,0001$), mas não entre as linhagens ($F=3,3$, $p=0,075$), tendo havido interação significativa entre estes critérios ($F=16,50$, $p=0,0002$). Para ambas as linhagens, concentrações plasmáticas de F significativamente mais altas foram encontradas nos grupos tratados, quando comparados aos respectivos controles. Entretanto, quando as linhagens foram comparadas, apenas nos grupos tratados as concentrações plasmáticas de F foram significativamente mais altas para os animais da linhagem 129P3/J quando comparados aos da linhagem A/J, sendo que para os grupos controle não houve diferença significativa entre as linhagens. Este padrão foi bastante

semelhante ao obtido em trabalho prévio do nosso grupo de pesquisa, no qual foi observada uma concentração de F significativamente maior nos animais da linhagem 129P3/J tratados com 50 mg/L de F (CARVALHO et al., 2009).

Figura 13 – Concentração média de F presente no plasma (mg/L) de F, dos camundongos das linhagens A/J e 129P3/J submetidos a tratamento com água contendo ou não 50 mg/L de F. Letras maiúsculas e minúsculas indicam diferença significativa entre as linhagens e tratamentos, respectivamente (ANOVA a 2 critérios após transformação logarítmica e teste de Bonferroni, $p < 0,05$. Barras indicam desvio-padrão. $n=15$, sendo cada resultado correspondente ao “pool” do plasma de 5 animais).

5.1.4 Análise de F incorporado no esmalte

Além das diferenças no metabolismo e na concentração de F nos tecidos (CARVALHO et al., 2013; CARVALHO et al., 2009; EVERETT, 2011; EVERETT et al., 2011; VIEIRA et al., 2005a; YAN et al., 2011), resultados clínicos e de fluorescência quantitativa (QLF) têm confirmado que os dentes dos animais da linhagem 129P3/J são mais resistentes aos efeitos do F (EVERETT et al., 2002). No entanto, os mecanismos envolvidos nesta resistência e susceptibilidade, em especial os genes candidatos e suas respectivas proteínas, ainda não foram determinados.

Estudos prévios mostraram pouca correlação entre a concentração de F nos dentes e o grau de severidade da fluorose dentária (RICHARDS; FEJERSKOV; BAEUM, 1989; RICHARDS et al., 1992; VIEIRA et al., 2005a). Além disso, em terceiros molares inclusos de

peessoas residentes em cidades com níveis ótimos e sub-ótimos de F na água de beber (0,2 – 1,0 mg/L de F), não foi observada correlação entre a concentração de F do esmalte e a severidade da fluorose dentária, além de ter sido relatada uma fraca correlação entre a concentração de F na dentina e o grau de severidade da fluorose (VIEIRA et al., 2004). Mesmo quando uma correlação estava presente, a concentração de F no dente explicava pouco a severidade da fluorose. Em adição, estudos epidemiológicos têm mostrado que certos grupos étnicos são mais susceptíveis à fluorose dentária do que outros (BUTLER; SEGRETO; COLLINS, 1985; RUSSELL, 1962; WILLIAMS; ZWEMER, 1990) sugerindo-se assim, uma influência não somente do ambiente mas também um envolvimento genético na severidade da fluorose dentária.

Nesse sentido, Vieira et al. (2005a) investigaram a correlação entre a concentração de F no dente e a severidade da fluorose dentária e as propriedades mecânicas do dente (microdureza) em camundongos com diferentes susceptibilidade genética à fluorose dentária (A/J e 129P3/J). Para tanto, os camundongos foram expostos às variadas concentrações de F (0, 25, 50 e 100 mg/L de F) na água de beber, por 6 semanas. Mesmo para o grupo controle (0 mg/L de F na água), foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre as linhagens, ou seja, o esmalte dos camundongos 129P3/J apresentou valores de microdureza maiores (aproximadamente 22%) quando comparado ao esmalte da linhagem A/J, o que é condizente com os resultados de Everett et al (2009), que observaram, em cortes histológicos, um maior conteúdo proteico no esmalte do estágio de maturação dos animais da linhagem A/J, quando comparados àqueles da linhagem 129P3/J, mesmo sem tratamento com F. Estes resultados obtidos sem tratamento com F indicam que a dureza do esmalte é geneticamente determinada (VIEIRA et al., 2005a). Quando avaliados nos grupos que receberam 50 mg/L de F, foi verificada uma maior perda de microdureza na linhagem A/J (redução da microdureza de 71%) comparada a linhagem 129P3/J (redução de 15%), o que também é compatível com os cortes histológicos do trabalho de Everett et al. (2009), que revelaram extensa retenção de proteínas no esmalte em maturação dos animais da linhagem A/J tratados com 50 mg/L de F, o que levaria a uma grande redução na microdureza, como relatado por Vieira et al. (2005a). Os autores concluíram que tantos fatores genéticos (severidade da fluorose dentária) quanto ambientais (concentração de F no esmalte dentário) têm efeito similar nas propriedades biomecânicas dos dentes.

Diante disso, no intuito de confirmar tanto a influência genética (linhagens com diferentes susceptibilidades à fluorose dentária), como ambiental (exposição ao F), foi

avaliada, além da concentração plasmática de F, também a concentração de F nos incisivos dos respectivos camundongos. No presente estudo, a figura 14 mostra a concentração de F presente no esmalte dos incisivos ($n=15$) dos camundongos das linhagens A/J e 129P3/J, após o tratamento com F. A concentração média ($\pm$ DP) de F incorporado no esmalte dos incisivos dos camundongos foi de $471,4 \pm 215,8$ mg/kg, $151,7 \pm 58,8$ mg/kg para os animais do grupo controle das linhagens 129P3/J e A/J, respectivamente, e de $2711,2 \pm 1019,2$ mg/kg, $1756,9 \pm 921,6$ mg/kg para os animais das linhagens 129P3/J e A/J, respectivamente, tratados com água contendo 50 mg/L de F. A ANOVA a 2 critérios encontrou diferença significativa entre as linhagens ($F=11,36$, $p=0,0016$) e entre os tratamentos ($F=103,50$, $p<0,0001$), sem interação significativa entre ambos ($F=2,82$, $p=0,1004$). O tratamento com F levou a um aumento significativo na concentração deste íon nos incisivos dos camundongos para ambas as linhagens. Os animais da linhagem 129P3/J tiveram uma concentração de F nos incisivos maior que aquela encontrada nos animais da linhagem A/J, mas a diferença só foi significativa para o grupo tratado, refletindo os resultados observados para o plasma.

Figura 14. Concentração média de F (mgF/Kg) em incisivos superiores dos animais das linhagens A/J e 129P3/J que ingeriram ou não F (50 mg/L de F) através da água de beber. Letras maiúsculas e minúsculas indicam diferença significativa entre as linhagens e tratamentos, respectivamente. Barras indicam desvio-padrão. $n=15$ (ANOVA a 2 critérios e teste de Bonferroni, $p<0,05$).

Uma vez que as condições experimentais foram estritamente controladas nesse estudo e a ingestão de F pelos animais de ambas as linhagens foi semelhante, pode-se concluir que as diferenças nas concentrações de F no plasma e nos incisivos são devidas ao *“background”*

genético dos animais, como já tinha sido observado por Carvalho et al. (2009) para o plasma e fêmur destes animais. Entretanto, no estudo de Everett et al. (2002), que avaliou o acúmulo de F nos fêmures e nos incisivos como indicador da exposição ao F, os animais de ambas as linhagens acumularam quantidades similares de F nos fêmures e nos incisivos. Esse fato levou os autores a sugerirem que a eliminação do F pelo organismo não seria uma explicação suficiente para a resistência à fluorose dentária. Entretanto, no estudo de Everett et al. (2002), os autores não fizeram o ajuste na concentração de F na água administrada para os animais da linhagem A/J, que, portanto, ingeriram uma quantidade maior de F ao longo do experimento, fazendo com que as concentrações de F nos seus fêmures e incisivos fossem semelhantes aos animais da linhagem 129P3/J. Posteriormente, foi comprovado em um estudo metabólico (no qual as concentrações de F na água dos animais da linhagem A/J foram reduzidas, de forma a garantir a mesma ingestão de F para ambas as linhagens) que, contrariamente ao que era esperado, os animais da linhagem 129P3/J retêm mais F no organismo, o que faz seus níveis de F no fêmur e plasma serem maiores que aqueles encontrados nos animais da linhagem A/J. Esse achado é surpreendente, uma vez que a despeito dos maiores níveis circulantes de F, os animais da linhagem 129P3/J mostraram-se resistentes à fluorose dentária, que não se manifestou mesmo com a ingestão de água contendo 50 mg/L de F (CARVALHO et al., 2009).

5.2 ANÁLISE PROTEÔMICA

A amelogênese origina-se de eventos biológicos com notável peculiaridade, sendo, os mais marcantes, a secreção da matriz orgânica rica em proteínas e água pelos ameloblastos e a subsequente mineralização dessa matriz com remoção quase completa das proteínas e da água (AOBA et al., 1998; ATHANASSIOU-PAPAEFTHYMIOU et al., 2011; FINCHAM; MORADIAN-OLDAK; SIMMER, 1999; JOSEPHSEN; FEJERSKOV, 1977; JOSEPHSEN et al., 2010; LACRUZ et al., 2012a; LACRUZ et al., 2010b; NISHIKAWA; FUJIWARA; KITAMURA, 1988; RAUTH et al., 2009; ROBINSON et al., 1998). Sabe-se que os ameloblastos secretam as proteínas da matriz e são responsáveis pela criação e manutenção de um ambiente extracelular favorável à deposição mineral (ATHANASSIOU-PAPAEFTHYMIOU et al., 2011; LACRUZ et al., 2012a; LACRUZ et al., 2011; NISHIKAWA; FUJIWARA; KITAMURA, 1988; PAINE et al., 2001; ROBINSON et al., 1998; SIMMER; HU, 2001; SIMMER et al., 2012; SMITH, 1998; THESLEFF; NIEMINEN, 1996). Essas células epiteliais exibem um ciclo de vida caracterizado por mudanças

progressivas que refletem suas atividades em vários momentos da formação do esmalte (ATHANASSIOU-PAPAEFTHYMIU et al., 2011; LACRUZ et al., 2012a; LACRUZ et al., 2010b; MORADIAN-OLDAK, 2012; ZHENG et al., 2013). Inicialmente, os pré-ameloblastos ou ameloblastos em diferenciação apresentam-se cubóides e, a partir dos primeiros sinais de desenvolvimento odontogênico, tornam-se secretores e morfologicamente colunares. Seus núcleos e mitocôndrias polarizam-se no sentido proximal, enquanto que, um segundo complexo juncional desenvolve-se na sua extremidade distal, compartimentalizando o ameloblasto em um corpo e uma extensão denominada processo de Tomes, contra o qual o esmalte se forma (GERLACH; LINE, 2005).

A secreção de uma matriz macromolecular caracteriza a biomineralização do esmalte (BARTLETT; SIMMER, 1999; LACRUZ et al., 2012a; LACRUZ et al., 2010b; MORADIAN-OLDAK, 2012; SIMMER et al., 2012; SMITH, 1998). Durante o processo de biomineralização, a matriz orgânica do esmalte não se forma exclusivamente pelas AMELs e, mesmo que em menor quantidade, as proteínas pertencentes ao grupo não-amelogeninas desempenham consideráveis funções durante a formação do esmalte (HU et al., 2011; HU et al., 2012; IJIMA et al., 2010; IWASAKI et al., 2005; JOSEPHSEN et al., 2010; KHAN et al., 2013; LACRUZ et al., 2013; LACRUZ et al., 2012a; LACRUZ et al., 2010a; LACRUZ et al., 2012b; LACRUZ et al., 2010b; MORADIAN-OLDAK, 2012; RUAN et al., 2013). Na fluorose dentária, a amelogênese sofre a interferência do F, que interfere na proliferação, diferenciação e morfologia dos ameloblastos, bem como na matriz extracelular dos tecidos dentais alterando a secreção, processamento e degradação das proteínas, e ainda interfere na fase mineral modificando a nucleação, o crescimento dos cristais e suas propriedades químicas, além de modificar a interação na interface matriz extracelular-fase mineral dos tecidos dentais. O conteúdo proteico da matriz fica retido após o início do estágio de maturação do esmalte, momento em que deveria ser removido paulatinamente até ser quase totalmente degradado. (AOBA; FEJERSKOV, 2002; BRONCKERS; LYARUU; DENBESTEN, 2009; DENBESTEN; LI, 2011; DENBESTEN et al., 2002; ROBINSON; KIRKHAM, 1990).

A confirmação experimental da permanência da matriz do esmalte na fluorose foi baseada em diversos estudos que definiram quais eram as proteínas inerentes ao esmalte e quais funções desempenhavam ao longo da amelogênese (BARTLETT; SIMMER, 1999; BARTLETT et al., 2011; LACRUZ et al., 2012a; LACRUZ et al., 2010b; MORADIAN-OLDAK, 2012; SIMMER; HU, 2001; SMITH, 1998). Tem sido demonstrado que a matriz do esmalte, na presença de F, mineraliza-se inadequadamente, resultando em uma estrutura

porosa e friável, com excesso de conteúdo proteico (AOBA; FEJERSKOV, 2002; BRONCKERS; LYARUU; DENBESTEN, 2009; DENBESTEN; LI, 2011; DENBESTEN et al., 2002; DENBESTEN et al., 2011; LI et al., 2005; LYARUU et al., 2011; ROBINSON et al., 2004; ROBINSON et al., 2006; TANIMOTO et al., 2008).

Diante do conhecimento de que a formação do esmalte é um processo associado a grandes mudanças na expressão de proteínas, o que é perturbado no caso da fluorose dentária, a análise proteômica emerge como uma importante ferramenta para o estudo dos mecanismos moleculares envolvidos na patogenia da fluorose dentária e como esta é influenciada por fatores genéticos (susceptibilidade à fluorose) e ambientais (exposição ao F). A proteômica é uma abordagem sistemática para o mapeamento qualitativo e quantitativo de todo o proteoma, diferindo das abordagens moleculares convencionais que são capazes de analisar um número limitado de proteínas (ZHANG et al., 2010). Além de estudos proteômicos sobre o perfil global de proteínas presentes em um sistema em um dado momento, o número de estudos trazendo informações sobre o nível de expressão proteica também vem crescendo nos últimos anos (ZHU; SMITH; HUANG, 2010). A quantificação de diferenças entre dois ou mais estados fisiológicos de um sistema biológico é uma das tarefas mais importantes, assim como um dos maiores desafios das técnicas proteômicas (BANTSCHEFF et al., 2007). Dentre as múltiplas técnicas e instrumentos, a eletroforese bidimensional, combinada com a identificação de proteínas por espectrometria de massas, foi a ferramenta de escolha para o presente trabalho (GORG; WEISS; DUNN, 2004). Devido à presença de proteínas com diferentes massas moleculares no esmalte e, mais que isto, da presença de produtos de degradação proteica, que torna a faixa de massas moleculares de proteínas encontradas na matriz do esmalte mais ampla, foram empregados géis de gradiente, com porcentagem de acrilamida variando de 5-20%, na faixa de pH de 3 a 10, para uma adequada separação e retenção no gel das proteínas de interesse.

Durante as últimas décadas, uma revolução no entendimento dos processos biológicos e moleculares no desenvolvimento do esmalte tem sido observada. No entanto, a expressão de proteínas da matriz ao longo dos estágios funcionais da amelogênese ainda não está totalmente clara, e, muitos estudos têm procurado compreender o mecanismo pelo qual os ameloblastos despendem um longo período para formar uma camada de conteúdo orgânico com composição complexa, mas que seja posteriormente removida para prover o espaço físico necessário para a deposição e maturação final dos cristais de hidroxiapatita (AOBA et al., 1998; BARTLETT; SIMMER, 1999; BARTLETT et al., 2011; BARTLETT; SMITH, 2013;

BIZ et al., 2010; FINCHAM; MORADIAN-OLDAK, 1995; FINCHAM et al., 1995; HU et al., 2011; JOSEPHSEN et al., 2010; LACRUZ et al., 2012a).

Considerando-se que o F pode interferir na secreção e degradação de proteínas da matriz do esmalte durante a amelogênese (AOBA; FEJERSKOV, 2002; BRONCKERS; LYARUU; DENBESTEN, 2009; DENBESTEN; LI, 2011; WEI et al., 2013) e que fatores genéticos parecem influenciar no desenvolvimento da fluorose dentária (CARVALHO et al., 2013; CARVALHO et al., 2009; CONSTANTINOU et al., 1990; EVERETT, 2011; EVERETT et al., 2002; EVERETT et al., 2009; EVERETT et al., 2011; MABELYA et al., 1994; MOUSNY et al., 2008; RICKARDS et al., 2005; VIEIRA et al., 2005a; YODER et al., 1998), estudos que visam a identificação da expressão protéica neste processo poderão contribuir para a elucidação de sua patogênese. A utilização de camundongos susceptíveis ou resistentes à fluorose dentária, expostos a diferentes concentrações de F, mostrou-se um excelente modelo para o estudo destes eventos moleculares, empregando-se como variável de resposta, a análise proteômica.

5.2.1 Análise das imagens

A boa reprodutibilidade dos géis, ou seja, a semelhança do perfil protéico entre as réplicas é essencial para a sua análise comparativa, pois, possibilita a visualização dos perfis protéicos diferentes e facilita a sobreposição das imagens feitas no programa de análise dos mesmos. De maneira geral, o protocolo de extração escolhido foi bastante satisfatório, possibilitando a remoção de grande quantidade de interferentes, garantindo géis de boa qualidade, o que pode ser observado através da presença de proteínas ácidas, básicas, de alta e de baixa MM. Para a visualização dos *spots* de proteínas da matriz do esmalte, um total de 24 géis foram corados com azul de *Coomassie* coloidal G250 (2 linhagens, 2 tratamentos, 2 estágios de desenvolvimento do esmalte, em triplicata), para análise comparativa no *software*. A figura 15 mostra uma das triplicatas dos géis bidimensionais representativos de cada linhagem (129P3/J e A/J) para os estágios de secreção e maturação do esmalte, expostos ou não ao F.

Figura 15. Géis bidimensionais representativos de cada linhagem (129P3/J e A/J) para os estágios de secreção (MS) e maturação (MM) do esmalte, expostos (T) ou não (C) ao F.

Após a detecção automática realizada pelo programa *ImageMaster 2D Platinum 7.0* (GE Healthcare), foi realizada uma edição manual com correção, adição e remoção dos *spots*. Para a **matriz do esmalte do estágio de secreção**, foram detectados, para os grupos A/J e 129P3/J controle (C), 63 e 99 *spots*, respectivamente. Já para os animais tratados (T), os números correspondentes foram 107 e 137 *spots*, respectivamente. Já para **matriz do esmalte do estágio de maturação**, para o grupo controle (C) detectaram-se 16 *spots* para os animais da linhagem A/J e 8 *spots* para os animais da linhagem 129P3/J, respectivamente. Para o grupo tratado (T), os números correspondentes foram 94 e 24 *spots*, respectivamente. Estes resultados indicam que houve redução na abundância de proteínas do estágio de maturação quando comparado com o estágio de secreção. Em adição, o tratamento com F, aumentou consideravelmente o número de *spots* proteicos detectados em ambos os estágios (figura 16).

Figura 16. Número total de *spots* protéicos detectados por grupo, com base na análise das triplicatas realizada por meio do programa *Image Master 2D Platinum 7.0* (GE Healthcare).

As figuras de 17 a 20 mostram imagens representativas dos géis obtidos para a matriz do esmalte no **estágio de secreção** (figuras 17 e 18), e no **estágio de maturação** (figuras 19 e 20).

Figura 17. Gel bidimensional representativo para amostras provenientes da matriz do esmalte do **estágio de secreção** de animais da linhagem **A/J do grupo controle (A)** e linhagem **129P3/J do grupo controle (B)**. As proteínas foram focalizadas em *strips* de 13 cm e faixa de pH 3-10 linear, e em seguida separadas pela massa molecular em gel de poliacrilamida 5-20% e coradas com azul de *Coomassie* coloidal G250.

Figura 18. Gel bidimensional representativo para amostras provenientes da matriz do esmalte do **estágio de secreção**, de animais da linhagem **A/J do grupo tratado (A)** e **129P3/J do grupo tratado (B)**. As proteínas foram focalizadas em *strips* de 13 cm e faixa de pH 3-10 linear, e em seguida separadas pela massa molecular em gel de poliacrilamida em gradiente 5-20% e coradas com azul de *Coomassie* coloidal G250.

Figura 19. Gel bidimensional representativo para amostras provenientes da matriz do esmalte do **estágio de maturação**, de animais da linhagem **A/J do grupo controle (A)** e **129P3/J do grupo controle (B)**. As proteínas foram focalizadas em *strips* de 13 cm e faixa de pH 3-10 linear, e em seguida separadas pela massa molecular em gel de poliacrilamida em gradiente 5-20% e coradas com azul de *Coomassie* coloidal G250.

Figura 20. Gel bidimensional representativo para amostras provenientes da matriz do esmalte do **estágio de maturação**, de animais da linhagem **A/J do grupo tratado (A)** e **129P3/J do grupo tratado (B)**. As proteínas foram focalizadas em *strips* de 13 cm e faixa de pH 3-10 linear, e em seguida separadas pela massa molecular em gel de poliacrilamida em gradiente 5-20% e coradas com azul de *Coomassie* coloidal G250.

5.2.2 Análise comparativa entre os grupos

Com relação à análise comparativa entre os grupos A/JC_MS e 129P3/JC_MS, 20 *spots* encontravam-se diferencialmente expressos ($p < 0,05$), dos quais 8 foram identificados por espectrometria de massas (MS), cujas proteínas estão descritas na tabela 2. Pode-se observar ainda que 13 *spots* estavam presentes exclusivamente nos animais do grupo A/JC_MS, porém, apenas 9 *spot* foram identificados com sucesso pela MS (tabela 3). Por outro lado, 49 *spots* estavam presentes apenas no grupo 129P3/JC_MS, dos quais 33 *spots* obtiveram sucesso de identificação (tabela 4). A figura 21 ilustra a análise comparativa dando destaque para alguns *spots* aqui identificados.

Outra análise comparativa foi realizada entre os grupos A/JT_MS e 129P3/JT_MS, 3 *spots* se encontravam diferencialmente expressos ($p < 0,05$), os quais foram todos identificados pela MS, cujas proteínas estão descritas na tabela 5. Observou-se a existência de 17 *spots* apenas presentes nas amostras provenientes dos animais do grupo A/JT_MS, dos quais 7 *spots* foram identificados com sucesso pela MS (tabela 6). Por outro lado, 47 *spots* estavam presentes apenas no grupo 129P3/JT_MS, dos quais 20 foram identificados com sucesso (tabela 7). A figura 22 ilustra a análise comparativa dando destaque para alguns *spots* aqui identificados.

Já para a análise comparativa entre os grupos A/JC_MM e 129P3/JC_MM, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os *spots* detectados. Porém, 13 *spots* estavam presentes exclusivamente nos animais do grupo A/JC_MM, onde 8 *spots* foram identificados com sucesso pela MS (tabela 8). Por outro lado, 5 *spots* estavam presentes apenas no grupo 129P3/JC_MM, dos quais 4 obtiveram sucesso de identificação (tabela 9).

Ainda para as comparações entre amostras provenientes da matriz de maturação, compararam-se os grupos A/JT_MM e 129P3/JT_MM, observando-se a existência de 4 *spots* com diferença significativa de expressão ($p < 0,05$), os quais foram todos identificados pela MS, e as respectivas proteínas estão descritas na tabela 10. Foi constatada a existência de 77 *spots* exclusivos das amostras provenientes dos animais do grupo A/JT_MM, porém, apenas 59 *spots* foram identificados com sucesso pela MS (tabela 11). Já para as amostras provenientes do grupo 129P3/JT_MM, verificou-se que 7 *spots* estavam presentes exclusivamente neste grupo, dos quais 3 *spots* foram identificados com sucesso (tabela 12). A figura 23 ilustra a análise comparativa dando destaque para alguns *spots* aqui identificados.

Além de se compararem as linhagens entre si, também se optou por comparar os grupos de tratamento (C vs T) dentro de cada linhagem. Assim, para a análise comparativa

entre os grupos A/JC_MS e A/JT_MS, 27 *spots* encontravam-se diferencialmente expressos ($p < 0,05$), dos quais 19 foram identificados por espectrometria de massas (MS), estando as proteínas correspondentes descritas na tabela 13. Pôde-se observar ainda que 15 *spots* estavam presentes exclusivamente nos animais do grupo A/JC_MS, dos quais 9 *spots* foram identificados com sucesso pela MS (tabela 14). Por outro lado, 59 *spots* estavam presentes apenas no grupo A/JT_MS, dos quais 43 obtiveram sucesso de identificação (tabela 15). A figura 24 ilustra a análise comparativa dando destaque para alguns *spots* aqui identificados.

Para a análise comparativa entre os grupos A/JC_MM e A/JT_MM, 3 *spots* encontravam-se diferencialmente expressos, dos quais 3 foram identificados por espectrometria de massas (MS), estando as proteínas correspondentes descritas na tabela 16. Pôde-se observar que 3 *spots* estavam presentes exclusivamente nos animais do grupo A/JC_MM, dos quais 2 foram identificados com sucesso (tabela 17). Já para o grupo A/JT_MM, 90 *spots* pertenciam apenas a este grupo, dos quais 62 obtiveram sucesso de identificação (tabela 18). A figura 25 ilustra a análise comparativa dando destaque para alguns *spots* aqui identificados.

Para a análise entre os grupos 129P3/JC_MS e 129P3/JT_MS, apenas 1 *spot* encontrava-se diferencialmente expresso ($p < 0,05$), que foi identificado por pela MS (tabela 19). Pôde-se observar ainda que 3 *spots* estavam presentes exclusivamente nos animais do grupo 129P3/JC_MS, dos quais 2 *spots* obtiveram sucesso na identificação (tabela 20). Quando se olhou para o grupo 129P3/JT_MS, 41 *spots* estavam presentes apenas neste grupo, dos quais 24 obtiveram sucesso na identificação (tabela 21). A figura 26 ilustra a análise comparativa dando destaque para alguns *spots* aqui identificados.

Já a comparação entre os grupos 129P3/JC_MM e 129P3/JT_MM, 1 *spot* encontrava-se diferencialmente expresso ($p < 0,05$), sendo este identificado pela MS (tabela 22). Pôde-se observar ainda que o grupo 129P3/JC_MM apresentava 4 *spots* exclusivos, dos quais 3 *spots* obtiveram sucesso na identificação (tabela 23). Quando se observou o grupo 129P3/JT_MM, 20 *spots* estavam presentes apenas neste grupo, dos quais 12 obtiveram sucesso na identificação (tabela 24).

Figura 21 – A figura acima destaca alguns *spots* com diferença de expressão revelada pela ANOVA ($p < 0,05$). À direita, seta em azul, o *spot* 72 encontra-se 1,3 vezes superexpresso em relação ao grupo 129P3/JC_MS, seta vermelha.

Figura 22 – A figura acima destaca alguns *spots* com diferença de expressão revelada pela ANOVA ($p < 0,05$). À direita, seta em azul, o *spot* 72 encontra-se 1,7 vezes superexpresso em relação ao grupo 129P3/JT_MS, seta vermelha.

Figura 23 – A figura acima destaca alguns *spots* ausentes no grupo 129P3/JT_MM, a esquerda, quando comparado ao grupo A/JT_MM, a direita . A seta azul indica o *spot* 72.

Figura 24 – A figura acima destaca alguns *spots* com diferença de expressão revelada pela ANOVA ($p < 0,05$). À direita, seta em azul, o *spot* 72 encontra-se 1,1 vez superexpresso em relação ao grupo A/JC_MS, seta vermelha.

Figura 25 – A figura acima destaca alguns *spots* ausentes no grupo A/JC_MM, a esquerda, quando comparado ao grupo A/JT_MM, a direita. A seta azul indica o *spot* 72.

Figura 26 – A figura acima destaca alguns *spots* com diferença de expressão revelada pela ANOVA ($p < 0,05$). À direita, seta em azul, o *spot* 72 encontra-se 1,2 vezes superexpresso em relação ao grupo 129P3/JC_MS, seta vermelha.

Tabela 2. Proteínas identificadas com diferença de expressão ($p < 0,05$) entre os grupos A/JC_MS e 129P3/JC_MS

Spot	Proteína	Score	Uniprot ID	pI /PM (KDa) teo.	pI/PM (KDa) Exp.	Dif. Exp.	Processo biológico	Função Biológica
03	Actin, cytoplasmic 1	140	P60710	5,1/41,73	7.6/25	↑ 129P3/J	Estrutura e organização	Proteína envolvida na mobilidade celular
	Putative uncharacterized protein	48				↑ 129P3/J	Não conhecida	
04	Peroxiredoxin-1	96	P35700	8,3/22,1	7.1/25	↑ 129P3/J	Processos celulares	Age como antioxidante
	Peroxiredoxin-4	45	O08807	7,1/31,0		↑ 129P3/J	Processos celulares	Age como antioxidante
37	Putative uncharacterized protein	83			4.7/51	↑ 129P3/J	Não conhecida	
44	Keratin, type I cytoskeletal 14	429	Q61781	4,8/52,8	4.8/50	↑ 129P3/J	Estrutura e organização	Organização do citoesqueleto
	Putative uncharacterized protein	83				↑ 129P3/J	Não conhecida	
51	BTB/POZ domain-containing protein KCTD12	47	Q6WVG3	5,6/35	5,7/38	↓ 129P3/J	Processos celulares	Transdução de sinal.
57	Adenylate kinase isoenzyme 1	176	Q9R0Y5	5,5/23,1	5,9/24	↓ 129P3/J	Metabolismo	Metabolismo de energia e síntese de nucleotídeos.
71	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase C	121	P30412	7,6/22,7	7,7/22	↓ 129P3/J	Vias da informação	Relacionada com o dobramento de proteínas
	Putative uncharacterized protein	86				↓ 129P3/J	Não conhecida	
92	Cytosolic phospholipase A2 beta	39	P0C871	6,0/88	5,8/56	↓ 129P3/J	Metabolismo	Degrada e metaboliza lipídios

Tabela 3. Proteínas pertencentes exclusivamente ao grupo A/JC_MS quando comparado ao grupo 129P3/JC_MS

Spot	Proteína	Score	Uniprot ID	pI /PM (KDa) teo.	pI/PM (KDa) Exp.	Processo biológico	Função Biológica
39	Putative uncharacterized protein	83			6,3/74	Não conhecida	
40	Putative uncharacterized protein	83			6,3/75	Não conhecida	
43	Vimentin	380	P20152	5,5/53	5,3/67	Estrutura e organização	Envolvida com a estabilização dos RNAm do colágeno tipo (CO1A1 e CO1A2)
	Tubulin alpha-1B chain	103	P05213	4,6/50,1		Estrutura e organização	É o maior constituinte de microtúbulos, envolvida na organização do citoesqueleto
76	Putative uncharacterized protein	77			8,3/25	Não conhecida	
82	Putative uncharacterized protein	82			8,3/22	Não conhecida	
90	Putative uncharacterized protein	69			5,8/46	Não conhecida	
106	Keratin, type II cytoskeletal 5	209	Q922U2	7,9/61,7	6,5/70	Estrutura e organização	Organização do citoesqueleto
107	Neurofilament heavy polypeptide	37	P19246	5,5/116,9	6,2/69	Estrutura e organização	Organização do citoesqueleto. Constituinte do microtúbulos.
159	Keratin, type I cytoskeletal 14	35	Q61781	4,8/52,8	7,6/24	Estrutura e organização	Organização do citoesqueleto

Tabela 4 . Proteínas pertencentes exclusivamente ao grupo 129P3/JC_MS quando comparado ao grupo A/JC_MS.

Spot	Proteína	Score	Uniprot ID	pI /PM (KDa) teo.	pI/PM (KDa) Exp.	Processo biológico	Função Biológica
6	Putative uncharacterized protein	65			7,4/51	Não conhecida	
7	Pigment epithelium-derived factor	69	P97298	6,9/46,2	5,1/45	Estrutura e organização	Importante na regeneração óssea.
10	14-3-3 protein zeta/delta	324	P63101	4,4/27,7	4,2/31	Vias de informação	Vias de sinalização
	14-3-3 protein epsilon	46	P62258	4,3/29,1		Processos celulares	Transdução de sinal
11	14-3-3 protein gamma	93	P61982	4,5/28,3	4,3/31	Processos celulares	Transdução de sinal
13	Putative uncharacterized protein	447			7,0/46	Não conhecida	
20	Serotransferrin	51	Q92111	7,1/76,7	6,9/96	Transporte	Transporte de íons e íons ferro.
22	Putative uncharacterized protein	60			7,3/83	Não conhecida	
23	Putative uncharacterized protein	60			5,1/21	Não conhecida	
25	Malate dehydrogenase, cytoplasmic	343	P14152	6,5/36,5	6,3/37	Metabolismo	Metabolismo de carboidratos
	Putative uncharacterized protein	51				Não conhecida	
26	Beta-enolase	351	P21550	7,2/47,0	7,2/52	Metabolismo	Desenvolvimento e regeneração muscular, principalmente em músculos estriados.
27	Pigment epithelium-derived factor	563	P97298	6,9/46,2	6,9/52	Estrutura e organização	Presente na matriz óssea. Secretada por osteoblastos e osteoclastos, importante na regeneração óssea.
28	Putative uncharacterized protein	81			3,6/12	Não conhecida	
29	Putative uncharacterized protein	132			7,1/81	Não conhecida	
31	Putative uncharacterized protein	132			7,2/80	Não conhecida	

34	Putative uncharacterized protein	149			4,8/22	Não conhecida	
	Peroxiredoxin-2	149	Q61171	5,0/21,7	4,7/25	Processos Celulares	Age como antioxidante, proliferação celular, diferenciação celular.
35	Myosin light chain 1/3, skeletal muscle isoform	41	P05977	4,6/20,5		Estrutura e organização	Componente estrutural da fibra muscular, ligação com íons cálcio.
	Translationally-controlled tumor protein	44	P63028	4,4/19,46		Estrutura e organização	Componente importante microtúbulos, ligação com o cálcio.
53	14-3-3 protein zeta/delta	48	P63101	4,4/27,7	5,7/32	Vias de informação	Vias de sinalização
55	Prohibitin	57	P67778	5,4/29,8	5,9/29	Processos celulares	Transdução de sinal
	Putative uncharacterized protein	73			4,7/23	Não conhecida	
56	Peroxiredoxin-2	267	Q61171	5,0/21,7		Processos Celulares	Age como antioxidante. Participa da cascata de sinalização.
	Odorant binding protein Ib	318	P97337	6,2/19,3	5,8/16	Transporte	Movimento de substâncias nas células ou entre células, presentes em tecido nasal de camundongos.
59	Odorant binding protein Ia	141	P97336	5,3/18,4		Transporte	Movimento de substâncias nas células ou entre células, presentes em tecido nasal de camundongos.
60	Putative uncharacterized protein	69			5,5/15	Não conhecida	
61	Putative uncharacterized protein	67			4,9/12	Não conhecida	
66	Putative uncharacterized protein	60			7,6/20	Não conhecida	
67	Putative uncharacterized protein	60			7,4/21	Não conhecida	

83	Carbonic anhydrase 2	142	P00920	7,0/29,0	7,1/30	Transporte	Essencial para a reabsorção óssea e diferenciação dos osteoclastos. Transporte de dióxido de carbono CO ₂ .
	Carbonic anhydrase 1	41	P13634	6,9/28,3		Transporte	Transporte de íons, CO ₂ (dióxido de carbono) e íons metálicos (Zinco)
85	Putative uncharacterized protein	143			6,6/50	Não conhecida	
86	Putative uncharacterized protein	47			5,3/49	Não conhecida	
87	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase 48 kDa subunit	35	O54734	5,6/49,0	5,5/49	Processos celulares	Regulação celular
104	Protein disulfide-isomerase A3	50	P27773	6,1/56,6	5,9/63	Processos celulares	Regulação de processos apoptóticos, transdução de sinal.
105	Serotransferrin	40	Q921H1	7,1/76,7	6,0/64	Transporte	Transporte de íons metálicos
108	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	114	P52480	7,5/57,8	8,4/66	Metabolismo	Metabolismo enzimático
	Periostin	388	Q62009	7,2/90,2		Processos celulares	Transdução de sinal. Importante função na mineralização da matriz extracelular
112	Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial	53	P26443	8,1/61,3	7,4/61		
178	Putative uncharacterized protein	71			4,2/23	Não conhecida	

Tabela 5. Proteínas identificadas com diferença de expressão ($P < 0,05$) entre os grupos A/JT_MS e 129P3/JT_MS

Spot	Proteína	Score	Uniprot ID	pI /PM (KDa) teo.	pI/PM (KDa) Exp.	Dif. Exp.	Processo biológico	Função Biológica
03	Actin, cytoplasmic 1	140	P60710	5,1/41,73	7,6/25	↓ 129P3/J	Estrutura e organização	Proteína envolvida na mobilidade celular
	Putative uncharacterized protein	48				↓ 129P3/J	Não conhecida	
04	Peroxiredoxin-1	96	P35700	8,3/22,1	7,1/25	↓ 129P3/J	Processos celulares	Age como antioxidante
	Peroxiredoxin-4	45	O08807	7,1/31,0		↓ 129P3/J	Processos celulares	Age como antioxidante
7	Pigment epithelium-derived factor	69	P97298	6,9/46,2	5,1/45	↓ 129P3/J	Estrutura e organização	

Tabela 6. Proteínas pertencentes exclusivamente ao grupo A/JT_MS quando comparado ao grupo 129P3/JT_MS

Spot	Proteína	Score	Uniprot ID	pI /PM (KDa) teo.	pI/PM (KDa) Exp.	Processo biológico	Função Biológica
83	Carbonic anhydrase 2	142	P00920	7,0/29,0	7,1/30	Transporte	Essencial para a reabsorção óssea e diferenciação dos osteoclastos. Transporte de dióxido de carbono CO ₂ .
	Carbonic anhydrase 1	41	P13634	6,9/28,3		Transporte	Transporte de íons, CO ₂ (dióxido de carbono) e íons metálicos (Zinco)
145	Triosephosphate isomerase	114	P17751	5,4/32,1	7,2/28	Metabolismo	Biossíntese e degradação de carboidratos. Atua na glicogênese e glicólise.
	Putative uncharacterized protein	82				Não conhecida	
146	Putative uncharacterized protein	119			6,8/29	Não conhecida	
147	Putative uncharacterized protein	90			6,2/52	Não conhecida	
148	Putative uncharacterized protein	605			6,0/53	Não conhecida	
153	Serotransferrin	221	Q92111	6,9/76	6,7/92	Transporte	Transporte de íons
157	Putative uncharacterized protein	137				Não conhecida	
	Nucleoside diphosphate kinase A	57	P15532	7,5/17,2	7,3/15	Metabolismo	Metabolismo energético Síntese de nucleotídeos-ATP

Tabela 7. Proteínas pertencentes exclusivamente ao grupo 129P3/JT_MS quando comparado ao grupo A/JT_MS.

Spot	Proteína	Score	Uniprot ID	pI /PM (KDa) teo.	pI/PM (KDa) Exp.	Processo biológico	Função Biológica
29	Putative uncharacterized protein	132			7,0/81	Não conhecida	
31	Putative uncharacterized protein	132			7,2/80	Não conhecida	
34	Putative uncharacterized protein	149			4,8/22	Não conhecida	
56	Putative uncharacterized protein	73			4,7/23	Não conhecida	
	Peroxiredoxin-2	267	Q61171	5,0/21,7		Processos Celulares	Age como antioxidante. Participa da cascata de sinalização.
64	Putative uncharacterized protein	171			9,7/12	Não conhecida	
76	Putative uncharacterized protein	77			8,3/25	Não conhecida	
84	Serpin H1	72	P19324	8,8/46,5	7,8/28	Metabolismo	Metabolismo de enzimas. Resposta ao estresse. Biossíntese e organização de colágeno e atividade proteolítica.
89	Putative uncharacterized protein	69			5,6/46	Não conhecida	
90	Putative uncharacterized protein	69			5,8/46	Não conhecida	
92	Cytosolic phospholipase A2 beta	39	P0C871	6,0/88	5,8/56	Metabolismo	Degrada e metaboliza lipídios
106	Keratin, type II cytoskeletal 5	209	Q922U2	7,9/61,7	6,5/70	Estrutura e organização	Organização do citoesqueleto
107	Neurofilament heavy polypeptide	37	P19246	5,5/116,9	6,2/69	Estrutura e organização	Organização do citoesqueleto. Constituinte do microtúbulos.
108	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	114	P52480	7,5/57,8	8,4/66	Metabolismo	Metabolismo enzimático
	Periostin	388	Q62009	7,2/90,2		Processos celulares	Transdução de sinal. Importante função na mineralização da matriz extracelular
112	Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial	53	P26443	8,1/61,3	7,4/61		
160	Nucleoside diphosphate kinase B	117	Q01768	7,6/17,3	7,5/14	Metabolismo	Metabolismo energético

161	Putative uncharacterized protein	203		8,2/22	Não conhecida	
165	Putative uncharacterized protein	122		6,1/59	Não conhecida	
	Aldehyde dehydrogenase	46	P47738	7,6/56,5	Processos celulares	Transdução de sinal
168	Keratin, type II cytoskeletal 5	402	Q922U2	7,9/61,7	5,5/62	Estrutura e organização Organização do citoesqueleto
171	Putative uncharacterized protein	164		4,2/21	Não conhecida	
175	Aconitate hydratase, mitochondrial	90	Q99KI0	8,0/85,4	8,3/88	

Tabela 8. Proteínas pertencentes exclusivamente ao grupo A/JC_MM quando comparado ao grupo 129P3/JC_MM

Spot	Proteína	Score	Uniprot ID	pI /PM (KDa) teo.	pI/PM (KDa) Exp.	Processo biológico	Função Biológica
01	Putative uncharacterized protein	67			7,3/11	Não conhecida	
	Annexin A5	1215	P48036	4,5/35,7		Processos celulares	Transdução de sinal. Regulação de liberação de cálcio dos reservatórios intracelulares
05	Putative uncharacterized protein	151			4,4/36	Não conhecida	
	Actin, cytoplasmic 1	122	P60710	5,1/41,7		Estrutura e organização	Proteína envolvida na mobilidade celular
18	Tenascin-W	402	Q70HX0	5,0/173,0	4,9/158	Processos Celulares	Transdução de sinal
	Putative uncharacterized protein	73					
43	Vimentin	380	P20152	5,5/53	5,3/67	Estrutura e organização	Vimentin is attached to the nucleus, endoplasmic reticulum, and mitochondria, either laterally or terminally. Involved with LARP6 in the stabilization of type I collagen mRNAs for CO1A1 and CO1A2
	Tubulin alpha-1B chain	103	P05213	4,6/50,1		Estrutura e organização	É o maior constituinte de microtúbulos, envolvida na organização do citoesqueleto
49	Heat shock cognate 71 kDa protein	37	P63017	5,1/70,8	5,5/75	Vias de informação	Atua como uma chaperona nas proteínas, regulação da transcrição, regulação do ciclo celular
51	BTB/POZ domain-containing protein KCTD12	47	Q6WVG3	5,6/35	5,7/38	Processos celulares	Transducao de sinal.
120	Tenascin-N	601	Q80Z71	5,0/173,0	5,1/111	Processos celulares	Transdução de sinal, regulação do crescimento e migração celular, adesão de células da matriz extracelular
126	Putative uncharacterized protein	35			7,6/25	Não conhecida	

Tabela 9. Proteínas pertencentes exclusivamente ao grupo 129P3/JC_MM quando comparado ao grupo A/JC_MM.

Spot	Proteína	Score	Uniprot ID	pI /PM (KDa) teo.	pI/PM (KDa) Exp.	Processo biológico	Função Biológica
64	Putative uncharacterized protein	171			9,7/12	Não conhecida	
138	Rho-related GTP-binding protein	34	Q62159	6,5/22,0	5,1/62	Processos celulares	Transdução de sinal
	Putative unchara3cterized protein	53				Não conhecida	
139	Putative uncharacterized protein	333			7,7/25	Não conhecida	
140	Putative uncharacterized protein	57			5,4/76	Não conhecida	

Tabela 10. Proteínas identificadas com diferença de expressão ($p < 0,05$) entre os grupos A/JT_MM e 129P3/JT_MM

Spot	Proteína	Score	Uniprot ID	pI /PM (KDa) teo.	pI/PM (KDa) Exp.	Dif. Exp.	Processo biológico	Função Biológica
04	Peroxiredoxin-1	96	P35700	8,3/22,1	7,1/25	↓ 129P3/J	Processos celulares	Age como antioxidante
	Peroxiredoxin-4	45	O08807	7,1/31,0		↓ 129P3/J	Processos celulares	Age como antioxidante
06	Putative uncharacterized protein	65			7,4/51	↑ 129P3/J	Não conhecida	
07	Pigment epithelium-derived factor	69	P97298	6,9/46,2	5,1/45	↑ 129P3/J	Estrutura e organização	
08	Catenin alpha-1	41	P26231	6,0/100,1	5,0/47	↓ 129P3/J	Estrutura e organização estrutural	Estrutura do citoesqueleto. Proteína envolvida na odontogenese.
	Protein KASH5	35	Q80VJ8	4,5/72,4		↓ 129P3/J	Processos celulares	Envolvida no complexo de Golgi
	Putative uncharacterized protein	73				↓ 129P3/J	Não conhecida	

Tabela 11. Proteínas pertencentes exclusivamente ao grupo A/JT_MM quando comparado ao grupo 129P3/JT_MM.

Spot	Proteína	Score	Uniprot ID	pI /PM (KDa) teo.	pI/PM (KDa) Exp.	Processo biológico	Função Biológica
10	14-3-3 protein zeta/delta	324	P63101	4,4/27,7	4,2/31	Vias de informação	Vias de sinalização
	14-3-3 protein epsilon	46	P62258	4,3/29,1		Processos celulares	Transdução de sinal
11	14-3-3 protein gamma	93	P61982	4,5/28,3	4,3/31	Processos celulares	Transdução de sinal
12	Putative uncharacterized protein	191	Q99LL6	5,5/38	4,8/37	Não conhecida	Biossíntese e organização das fibras colágenas, envolvido na ossificação e mineralização dentária.
	Col1a1 protein	48				Estrutura e organização	
13	Putative uncharacterized protein	447	Q70HX0	5,0/173,0	7,0/46	Não conhecida	Proteína envolvida na mobilidade celular
14	Putative uncharacterized protein	90			7,1/83	Não conhecida	
15	Actin, cytoplasmic 2	543	P63260	5,1/41,7	7,0/83	Estrutura e organização	Proteína envolvida na mobilidade celular
18	Tenascin-W	402	P29391	6,5/36,5	4,9/158	Processos Celulares	Transdução de sinal
	Putative uncharacterized protein	73					
22	Putative uncharacterized protein	60	P21550	7,2/47,0	7,3/83	Não conhecida	Transporte de íons ferro, armazena e libera ferro
23	Putative uncharacterized protein	60			5,1/21	Não conhecida	
24	Ferritin light chain 1	122	P14152	6,5/36,5	5,7/25	Transporte	Transporte de íons ferro, armazena e libera ferro
	Putative uncharacterized protein	92				Não conhecida	
25	Malate dehydrogenase, cytoplasmic	343	P21550	7,2/47,0	6,3/37	Metabolismo	Metabolismo de carboidratos
	Putative uncharacterized protein	51				Não conhecida	
26	Beta-enolase	351	P21550	7,2/47,0	7,6/52	Metabolismo	Metabolismo de carboidratos

27	Pigment epithelium-derived factor	563	P97298	6,9/46,2	6,9/52	Estrutura e organização	Presente na matriz óssea. Secretada por osteoblastos e osteoclastos, importante na regeneração óssea.
33	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	248	P56480	4,9/56,3	5,1/54	Metabolismo	Metabolismo energético
37	Putative uncharacterized protein	83			4,7/51	Não Conhecida	
38	Putative uncharacterized protein	94			5,3/54	Não conhecida	
41	Putative uncharacterized protein	56			6,1/86	Não conhecida	
42	Putative uncharacterized protein	56			6,2/86	Não conhecida	
43	Vimentin	380	P20152	5,5/53	5,3/67	Estrutura e organização 1	Envolvida com a estabilização dos RNAm do colágeno tipo (CO1A1 e CO1A2)
	Tubulin alpha-1B chain	103	P05213	4,6/50,1		Estrutura e organização	É o maior constituinte de microtúbulos, envolvida na organização do citoesqueleto
44	Keratin, type I cytoskeletal 14	429	Q61781	4,8/52,8	4,8/50	Estrutura e organização	Organização do citoesqueleto
	Putative uncharacterized protein	83				Não conhecida	
45	Actin, cytoplasmic 1	91	P60710	5,1/41,73	5,0/53	Estrutura e organização	Proteína envolvida na mobilidade celular
46	Gamma actin-like protein	91	Q9QZ83	5,1/41,7	5,0/53	Estrutura e organização	Proteína envolvida na mobilidade celular
51	BTB/POZ domain-containing protein KCTD12	47	Q6WVG3	5,6/35	5,7/38	Processos celulares	Transdução de sinal.
53	14-3-3 protein zeta/delta	48	P63101	4,4/27,7	5,7/32	Vias de informação	Vias de sinalização
54	Gamma actin-like protein	93	Q9QZ83	5,1/41,7	5,8/30	Estrutura e organização	Proteína envolvida na mobilidade celular
	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta, mitochondrial	91	Q9D051	6,8/38,9		Metabolismo	Metabolismo de Carboidratos
	Annexin A4	76	P97429	5,1/35,9			
55	Prohibitin	57	P67778	5,4/29,8	5,9/29	Processos celulares	Transdução de sinal
57	Adenylate kinase isoenzyme 1	176	Q9R0Y5	5,5/23,1	5,9/24	Metabolismo	Metabolismo de energia e síntese de nucleotídeos.

58	Putative uncharacterized protein	61			5,8/25	Não conhecida	
	Apolipoprotein A-I	36	Q00623	5,4/30,5		Transporte e metabolismo	Transporte de lipídios e biossíntese de lipídios
59	Odorant binding protein Ib	318	P97337	6,2/19,3		Transporte	Movimento de substâncias nas células ou entre células, presentes em tecido nasal de camundongos.
	Odorant binding protein Ia	141	P97336	5,3/18,4	5,8/16	Transporte	Movimento de substâncias nas células ou entre células, presentes em tecido nasal de camundongos.
60	Putative uncharacterized protein	69			5,5/15	Não conhecida	
65	Putative uncharacterized protein	56				Não conhecida	
	Nucleoside diphosphate kinase B	55	Q01768	7,6/17,3	8,0/18	Metabolismo	Metabolismo energético. Síntese de nucleotídeo
66	Putative uncharacterized protein	60			7,6/20	Não conhecida	
67	Putative uncharacterized protein	60			7,4/21	Não conhecida	
69	Rho-related GTP-binding protein RhoC	77	Q62159	6,5/22,0		Processos celulares	Transdução de sinal
	Proteasome subunit alpha type-2	50	P49722	7,5/25,9		Metabolismo energético	Clivar peptídeos, possui atividade proteolítica, ATP-dependente
	Glutathione S-transferase P 1	36	P19157	8,0/23,6	7,1/25	Metabolismo	Metabolismo de aminoácidos, degradação de aminoácidos, e metabolismo de xenobióticos
70	Putative uncharacterized protein	89			7,3/24	Não conhecida	
71	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase C	121	P30412	7,6/22,7		Vias da informação	Relacionada com o dobramento de proteínas
	Putative uncharacterized protein	86			7,7/22	Não conhecida	
72	Amelogenin, X isoform	211	P63278	7,2/23,4	8,0/25	Estrutura e organização	Biomíneralização dos dentes, regula a formação dos cristais durante a fase secretória do desenvolvimento do esmalte dentário.
73	Putative uncharacterized protein	61			7,7/24	Não conhecida	

74	Amelogenin, X isoform	63	P63278	7,2/23,4	7,8/26	Estrutura e organização	Biomíneralização dos dentes, regula a formação dos cristais durante a fase secretória do desenvolvimento do esmalte dentário.
75	Glial fibrillary acidic protein	218	P03995	5,0/49,9	7,6/22	Estrutura e organização	Organização do citoesqueleto
	Putative uncharacterized protein	99	Q9CV72	8,3/59,5		Não conhecida	Estrutura e organização estrutural
76	Putative uncharacterized protein	77			8,3/25	Não conhecida	
77	Putative uncharacterized protein	42			7,6/28	Não conhecida	
79	Putative uncharacterized protein	52			7,0/27	Não conhecida	
80	Triosephosphate isomerase	102	P17751	5,4/32,1	6,9/27	Metabolismo	Biossíntese e degradação de carboidratos. Atua na glicogênese e glicólise. É uma fosfoproteína.
82	Putative uncharacterized protein	82				Não conhecida	
84	Serpin H1	72	P19324	8,8/46,5	7,8/28	Metabolismo	Metabolismo de enzimas. Chaperona. Resposta ao estresse. Biossíntese de colágeno, organização das fibrilas colágenas, maturação das proteínas, atividade proteolítica.
85	Putative uncharacterized protein	143			6,6/50	Não conhecida	
87	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase 48 kDa subunit	35	O54734	5,6/49,0	5,5/49	Processos celulares	Regulação celular
89	Putative uncharacterized protein	69			5,6/46	Não conhecida	
90	Putative uncharacterized protein	69			5,8/46	Não conhecida	
92	Cytosolic phospholipase A2 beta	39	P0C871	6,0/88	5,8/56	Metabolismo	Degrada e metaboliza lipídios
94	Tubulin alpha-1B chain	80	P05213	4,6/50,1	4,4/60	Estrutura e organização	Maior constituinte dos microtúbulos. Organização do citoesqueleto.
97	Putative uncharacterized protein	60			4,8/59	Não conhecida	
99	Keratin, type I cytoskeletal 10	67	P02535	4,7/57,0	5,1/59	Estrutura e organização	Organização do citoesqueleto

131	Putative uncharacterized protein	37		7,0/87	Não conhecida		
133	Putative uncharacterized protein	37		6,7/88	Não conhecida		
134	Putative uncharacterized protein	36		7,1/92	Não conhecida		
136	Fructose-bisphosphate aldolase	35	Q5FWB7	8,2/39,2	9,4/48	Metabolismo	Metabolismo de lipossacarídeos
137	Putative uncharacterized protein	60		4,2/26	Não conhecida		

Tabela 12. Proteínas pertencentes exclusivamente ao grupo 129P3/JT_MM quando comparado ao grupo A/JT_MM

Spot	Proteína	Score	Uniprot ID	pI /PM (KDa) teo.	pI/PM (KDa) Exp.	Processo biológico	Função Biológica
108	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	114	P52480	7,5/57,8	8,4/66	Metabolismo	Metabolismo enzimático
	Periostin	388	Q62009	7,2/90,2		Processos celulares	Transdução de sinal. Importante função na mineralização da matriz extracelular
112	Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial	53	P26443	8,1/61,3	7,4/61		
121	Rho-related GTP-binding protein RhoC	98	Q62159	6,5/22,0	7,8/23	Processos celulares	Transdução de sinal
	Putative uncharacterized protein	69				Não conhecida	

Tabela 13. Proteínas identificadas com diferença de expressão entre os grupos AJC_MS e A/JT_MS.

Spot	Proteína	Score	Uniprot ID	pI /PM (KDa) teo.	pI/PM (KDa) Exp.	Dif. Exp.	Processo biológico	Função Biológica
0	Putative uncharacterized protein	40			7,6/11	↓ A/JT	Não conhecida	
	Keratin, type II cytoskeletal 5	114	Q922U2	7,9/61,7		↓ A/JT	Estrutura e organização	Organização do citoesqueleto
02	Putative uncharacterized protein	417			8,2/11	↓ A/JT	Não conhecida	
04	Peroxiredoxin-1	96	P35700	8,3/22,1	7,1/25	↑ A/JT	Processos celulares	Age como antioxidante
	Peroxiredoxin-4	45	O08807	7,1/31,0		↑ A/JT	Processos celulares	Age como antioxidante
05	Annexin A5	1215	P48036	4,5/35,7	4,4/36	↓ A/JT	Processos celulares	Transdução de sinal. Regulação de liberação de cálcio dos reservatórios intracelulares
	Putative uncharacterized protein	151				↓ A/JT	Não conhecida	
	Actin, cytoplasmic 1	122	P60710	5,1/41,7		↓ A/JT	Estrutura e organização	Proteína envolvida na mobilidade celular
08	Catenin alpha-1	41	P26231	6,0/100,1	5,0/47	↑ A/JT	Estrutura e organização estrutural	Estrutura do citoesqueleto. Proteína envolvida na odontogenese.
	Protein KASH5	35	Q80VJ8	4,5/72,4		↑ A/JT	Processos celulares	Envolvida no complexo de golgi
	Putative uncharacterized protein	73				↑ A/JT	Não conhecida	
12	Putative uncharacterized protein	191			4,8/37	↓ A/JT	Não conhecida	
	Coll1a1 protein	48	Q99LL6	5,5/38		↓ A/JT	Estrutura e organização	Biossíntese e organização das fibras colágenas, envolvido na ossificação e mineralização dentária.
15	Actin, cytoplasmic 2	543	P63260	5,1/41,7	7,1/83	↓ A/JT	Estrutura e organização	Proteína envolvida na mobilidade celular
24	Ferritin light chain 1	122	P29391		5,7/25	↓ A/JT	Transporte	Transporte de íons ferro, armazena e libera ferro

	Putative uncharacterized protein	92			↓ A/JT	Não conhecida	
37	Putative uncharacterized protein	83		4,7/51	↓ A/JT	Não conhecida	
39	Putative uncharacterized protein	83		6,3/74	↓ A/JT	Não conhecida	
40	Putative uncharacterized protein	83		6,3/75	↓ A/JT	Não conhecida	
42	Putative uncharacterized protein	56		6,2/86	↑ A/JT	Não conhecida	
44	Keratin, type I cytoskeletal 14	429	Q61781	4,8/52,8	↓ A/JT	Estrutura e organização	Organização do citoesqueleto
	Putative uncharacterized protein	83		4,8/50	↓ A/JT	Não conhecida	
54	Gamma actin-like protein	93	Q9QZ83	5,1/41,7	↓ A/JT	Estrutura e organização	Proteína envolvida na mobilidade celular
	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta, mitochondrial	91	Q9D051	6,8/38,9	↓ A/JT	Metabolismo	Metabolismo de Carboidratos
	Annexin A4	76	P97429	5,1/35,9	↓ A/JT		
57	Adenylate kinase isoenzyme 1	176	Q9R0Y5	5,5/23,1	↓ A/JT	Metabolismo	Metabolismo de energia e síntese de nucleotídeos.
70	Putative uncharacterized protein	89		7,3/24	↑ A/JT	Não conhecida	
71	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase C	121	P30412	7,6/22,7	↑ A/JT	Vias da informação	Relacionada com o dobramento de proteínas
	Putative uncharacterized protein	86		7,7/22	↑ A/JT	Não conhecida	
97	Putative uncharacterized protein	60		4,8/59	↓ A/JT	Não conhecida	
99	Keratin, type I cytoskeletal 10	67	P02535	4,7/57,0	↓ A/JT	Estrutura e organização	Organização do citoesqueleto

Tabela 14. Proteínas pertencentes exclusivamente ao grupo A/JC_MS quando comparado ao grupo A/JT_MS

Spot	Proteína	Score	Uniprot ID	pI /PM (KDa) teo.	pI/PM (KDa) Exp.	Processo biológico	Função Biológica
64	Putative uncharacterized protein	171			9,7/12		
76	Putative uncharacterized protein	77			8,3/25	Não conhecida	
82	Putative uncharacterized protein	82			8,3/22	Não conhecida	
89	Putative uncharacterized protein	69			5,6/46		
90	Putative uncharacterized protein	69			5,8/46	Não conhecida	
92	Cytosolic phospholipase A2 beta	39	P0C871	6,0/88	5,8/56	Metabolismo	Degrada e metaboliza lipídios
106	Keratin, type II cytoskeletal 5	209	Q922U2	7,9/61,7	6,5/70	Estrutura e organização	Organização do citoesqueleto
107	Neurofilament heavy polypeptide	37	P19246	5,5/116,9	6,2/69	Estrutura e organização	Organização do citoesqueleto. Constituinte do microtúbulos.
159	Keratin, type I cytoskeletal 14	35	Q61781	4,8/52,8	7,6/24	Estrutura e organização	Organização do citoesqueleto

Tabela 15. Proteínas pertencentes exclusivamente ao grupo A/JT_MS quando comparado ao grupo A/JC_MS

Spot	Proteína	Score	Uniprot ID	pI /PM (KDa) teo.	pI/PM (KDa) Exp.	Processo biológico	Função Biológica
6	Putative uncharacterized protein	65			7,4/51	Não conhecida	
7	Pigment epithelium-derived factor	69	P97298	6,9/46,2	5,1/45	Estrutura e organização	Importante na regeneração óssea.
10	14-3-3 protein zeta/delta	324	P63101	4,4/27,7	4,2/31	Vias de informação	Vias de sinalização
	14-3-3 protein epsilon	46	P62258	4,3/29,1		Processos celulares	Transdução de sinal
11	14-3-3 protein gamma	93	P61982	4,5/28,3	4,3/31	Processos celulares	Transdução de sinal
13	Putative uncharacterized protein	447			7,0/46	Não conhecida	
20	Serotransferrin	51	Q92111	7,1/76,7	6,9/96	Transporte	Transporte de íons e íons ferro.
22	Putative uncharacterized protein	60			7,3/83	Não conhecida	
23	Putative uncharacterized protein	60			5,1/21	Não conhecida	
25	Malate dehydrogenase, cytoplasmic	343	P14152	6,5/36,5	6,3/37	Metabolismo	Metabolismo de carboidratos
	Putative uncharacterized protein	51				Não conhecida	
26	Beta-enolase	351	P21550	7,2/47,0	7,2/52	Metabolismo	Metabolismo de carboidratos
27	Pigment epithelium-derived factor	563	P97298	6,9/46,2	6,9/52	Estrutura e organização	Presente na matriz óssea. Secretada por osteoblastos e osteoclastos, importante na regeneração óssea.
28	Putative uncharacterized protein	81			3,6/11	Não conhecida	
35	Peroxiredoxin-2	149	Q61171	5,0/21,7	4,7/25	Processos Celulares	Age como antioxidante, proliferação celular, diferenciação celular.
	Myosin light chain 1/3, skeletal muscle isoform	41	P05977	4,6/20,5		Estrutura e organização	Componente estrutural da fibra muscular, ligação com íons cálcio.
	Translationally-controlled tumor protein	44	P63028	4,4/19,46		Estrutura e organização	Componente importante microtúbulos, ligação com o cálcio.
53	14-3-3 protein zeta/delta	48	P63101	4,4/27,7	5,7/32	Vias de informação	Vias de sinalização

55	Prohibitin	57	P67778	5,4/29,8	5,9/29	Processos celulares	Transdução de sinal
59	Odorant binding protein Ib	318	P97337	6,2/19,3	5,8/16	Transporte	Movimento de substâncias nas células ou entre células, presentes em tecido nasal de camundongos.
	Odorant binding protein Ia	141	P97336	5,3/18,4		Transporte	Movimento de substâncias nas células ou entre células, presentes em tecido nasal de camundongos.
60	Putative uncharacterized protein	69			5,5/15	Não conhecida	
61	Putative uncharacterized protein	67			4,9/12	Não conhecida	
65	Putative uncharacterized protein	56			8,0/18	Não conhecida	
	Nucleoside diphosphate kinase B	55	Q01768	7,6/17,3		Metabolismo	
66	Putative uncharacterized protein	60			7,6/20	Não conhecida	Metabolismo energético. Síntese de nucleotídeo
67	Putative uncharacterized protein	60			7,4/21	Não conhecida	
73	Putative uncharacterized protein	61			7,7/24	Não conhecida	
75	Glial fibrillary acidic protein	218	P03995	5,0/49,9	7,6/22	Estrutura e organização	Organização do citoesqueleto
	Putative uncharacterized protein	99	Q9CV72	8,3/59,5		Não conhecida	Estrutura e organização estrutural
77	Putative uncharacterized protein	42			7,6/28	Não conhecida	
78	Transforming protein RhoA	82	P61589		7,1/18	Processos celulares	Transdução de sinal. Regulação do transporte de íons cálcio
	Nucleoside diphosphate kinase A	55	P15532	7,5/17,2		Metabolismo	Síntese de nucleotídeos-ATP
79	Putative uncharacterized protein	52			7,0/27	Não conhecida	
80	Triosephosphate isomerase	102	P17751	5,4/32,1	6,9/27	Metabolismo	Biossíntese e degradação de carboidratos. Atua na glicogênese e glicólise. É uma fosfoproteína.
83	Carbonic anhydrase 2	142	P00920	7,0/29,0	7,1/30	Transporte	Essencial para a reabsorção óssea e diferenciação dos osteoclastos. Transporte de dióxido de carbono CO ₂ .
	Carbonic anhydrase 1	41	P13634	6,9/28,3		Transporte	Transporte de íons, CO ₂ (dióxido de carbono) e íons metálicos (Zinco)

85	Putative uncharacterized protein	143		6,6/50		Não conhecida	
86	Putative uncharacterized protein	47		5,3/49		Não conhecida	
87	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase 48 kDa subunit	35	O54734	5,6/49,0	5,5/49	Processos celulares	Regulação celular
104	Protein disulfide-isomerase A3	50	P27773	6,1/56,6	5,9/63	Processos celulares	Regulação de processos apoptóticos, transdução de sinal.
105	Serotransferrin	40	Q921I1	7,1/76,7	6,0/64	Transporte	Transporte de íons metálicos
114	Putative uncharacterized protein	239			7,1/94		
	Elongation factor 2	239	P58252	6,8/95,3		Metabolismo	Biossíntese de proteínas
117	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	258	Q01853	4,8/89,3	5,0/94	Transporte	Envolvido na formação e transição do complexo de Golgi. Transporte de ácidos nucleicos, importante proteína do retículo endoplasmático (ER)
119	Alcohol dehydrogenase [NADP(+)]	81	Q9JII6	7,4/36,5	7,4/38	Metabolismo	Metabolismo de Xenofobico
	1,5-anhydro-D-fructose reductase	38	Q9DCT1	7,3/34,4		Metabolismo	Metabolismo energético
120	Tenascin-N	601	Q80Z71	5,0/173,0	5,1/111	Processos celulares	Transdução de sinal, regulação do crescimento e migração celular, adesão de células da matriz extracelular
145	Triosephosphate isomerase	114	P17751	5,4/32,1	7,2/28	Metabolismo	Biossíntese e degradação de carboidratos. Atua na glicogênese e glicólise.
	Putative uncharacterized protein	82				Não conhecida	
146	Putative uncharacterized protein	119			6,8/29	Não conhecida	
147	Putative uncharacterized protein	90			6,2/52	Não conhecida	
148	Putative uncharacterized protein	605			6,0/53	Não conhecida	
153	Serotransferrin	221	Q921I1	6,9/76	6,7/92	Transporte	Transporte de íons
157	Putative uncharacterized protein	137			7,3/15	Não conhecida	
	Nucleoside diphosphate kinase A	57	P15532	7,5/17,2		Metabolismo	Metabolismo energético Síntese de nucleotídeos-ATP

Tabela 16. Proteínas com diferença de expressão entre os grupos A/JC_MM quando comparado ao grupo A/JT_MM

<i>Spot</i>	Proteína	Score	Uniprot ID	pI /PM (KDa) teo.	pI/PM (KDa) Exp.	Dif. Exp.	Processo biológico	Função Biológica
05	Annexin A5	1215	P48036	4,5/35,7	4,4/36	↑A/JT	Processos celulares	Transdução de sinal. Regulação de liberação de cálcio dos reservatórios intracelulares
	Putative uncharacterized protein	151				↑A/JT	Não conhecida	
	Actin, cytoplasmic 1	122	P60710	5,1/41,7		↑A/JT	Estrutura e organização	Proteína envolvida na mobilidade celular
08	Catenin alpha-1	41	P26231	6,0/100,1	5,0/47	↑A/JT	Estrutura e organização estrutural	Estrutura do citoesqueleto. Proteína envolvida na odontogenese.
	Protein KASH5	35	Q80VJ8	4,5/72,4		↑A/JT	Processos celulares	Envolvida no complexo de golgi
	Putative uncharacterized protein	73				↑A/JT	Não conhecida	
51	BTB/POZ domain-containing protein KCTD12	47	Q6WVG3	5,6/35	5,7/38	↑A/JT	Processos celulares	Transdução de sinal.

Tabela 17. Proteínas pertencentes exclusivamente ao grupo A/JC_MM quando comparado ao grupo A/JT_MM

Spot	Proteína	Score	Uniprot ID	pI /PM (KDa) teo.	pI/PM (KDa) Exp.	Processo biológico	Função Biológica
120	Tenascin-N	601	Q80Z71	5,0/173,0	5,1/111	Processos celulares	Transdução de sinal, regulação do crescimento e migração celular, adesão de células da matriz extracelular
126	Putative uncharacterized protein	35			7,6/25	Não conhecida	

Tabela 18. Proteínas pertencentes exclusivamente ao grupo A/JT_MM quando comparado ao grupo A/JC_MM

<i>Spot</i>	<i>Proteína</i>	<i>Score</i>	<i>Uniprot ID</i>	<i>pI /PM (KDa) teo.</i>	<i>pI/PM (KDa) Exp.</i>	<i>Processo biológico</i>	<i>Função Biológica</i>
03	Actin, cytoplasmic 1	140	P60710	5,1/41,73	7,6/25	Estrutura e organização	Proteína envolvida na mobilidade celular
	Putative uncharacterized protein	48				Não conhecida	
04	Peroxiredoxin-1	96	P35700	8,3/22,1	7,1/25	Processos celulares	Age como antioxidante
	Peroxiredoxin-4	45	O08807	7,1/31,0		Processos celulares	Age como antioxidante
6	Putative uncharacterized protein	65			7,4/51	Não conhecida	
7	Pigment epithelium-derived factor	69	P97298	6,9/46,2	5,1/45	Estrutura e organização	Importante na regeneração óssea.
10	14-3-3 protein zeta/delta	324	P63101	4,4/27,7	4,2/31	Vias de informação	Vias de sinalização
	14-3-3 protein epsilon	46	P62258	4,3/29,1		Processos celulares	Transdução de sinal
11	14-3-3 protein gamma	93	P61982	4,5/28,3	4,3/31	Processos celulares	Transdução de sinal
12	Putative uncharacterized protein	191	Q99LL6	5,5/38	4,8/37	Não conhecida	
	Colla1 protein	48				Estrutura e organização	Biossíntese e organização das fibras colágenas, envolvido na ossificação e mineralização dentária.
13	Putative uncharacterized protein	447			7,0/46	Não conhecida	
14	Putative uncharacterized protein	90			7,1/83	Não conhecida	
15	Actin, cytoplasmic 2	543	P63260	5,1/41,7	7,0/83	Estrutura e organização	Proteína envolvida na mobilidade celular
22	Putative uncharacterized protein	60			7,3/83	Não conhecida	
23	Putative uncharacterized protein	60			5,1/21	Não conhecida	
24	Ferritin light chain 1	122	P29391		5,7/25	Transporte	Transporte de íons ferro, armazena e libera ferro
	Putative uncharacterized protein	92				Não conhecida	

25	Malate dehydrogenase, cytoplasmic	343	P14152	6,5/36,5	6,3/37	Metabolismo	Metabolismo de carboidratos
	Putative uncharacterized protein	51				Não conhecida	
26	Beta-enolase	351	P21550	7,2/47,0	7,6/52	Metabolismo	Metabolismo de carboidratos
27	Pigment epithelium-derived factor	563	P97298	6,9/46,2	6,9/52	Estrutura e organização	Presente na matriz óssea. Secretada por osteoblastos e osteoclastos, importante na regeneração óssea.
33	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	248	P56480	4,9/56,3	5,1/54	Metabolismo	Metabolismo energético
37	Putative uncharacterized protein	83			4,7/51	Não Conhecida	
38	Putative uncharacterized protein	94			5,3/54	Não conhecida	
41	Putative uncharacterized protein	56			6,1/86	Não conhecida	
42	Putative uncharacterized protein	56			6,2/86	Não conhecida	
44	Keratin, type I cytoskeletal 14	429	Q61781	4,8/52,8	4,8/50	Estrutura e organização	Organização do citoesqueleto
	Putative uncharacterized protein	83				Não conhecida	
45	Actin, cytoplasmic 1	91	P60710	5,1/41,73	5,0/53	Estrutura e organização	Proteína envolvida na mobilidade celular
46	Gamma actin-like protein	91	Q9QZ83	5,1/41,7	5,0/53	Estrutura e organização	Proteína envolvida na mobilidade celular
53	14-3-3 protein zeta/delta	48	P63101	4,4/27,7	5,7/32	Vias de informação	Vias de sinalização
54	Gamma actin-like protein	93	Q9QZ83	5,1/41,7	5,8/30	Estrutura e organização	Proteína envolvida na mobilidade celular
	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta, mitochondrial	91	Q9D051	6,8/38,9		Metabolismo	Metabolismo de Carboidratos
	Annexin A4	76	P97429	5,1/35,9			
55	Prohibitin	57	P67778	5,4/29,8	5,9/29	Processos celulares	Transdução de sinal
57	Adenylate kinase isoenzyme 1	176	Q9R0Y5	5,5/23,1	5,9/24	Metabolismo	Metabolismo de energia e síntese de nucleotídeos.
58	Putative uncharacterized protein	61			5,8/25	Não conhecida	
	Apolipoprotein A-I	36	Q00623	5,4/30,5		Transporte e metabolismo	Transporte de lipídios e biossíntese de lipídios

59	Odorant binding protein Ib	318	P97337	6,2/19,3	5,8/16	Transporte	Movimento de substâncias nas células ou entre células, presentes em tecido nasal de camundongos.
59	Odorant binding protein Ia	141	P97336	5,3/18,4		Transporte	Movimento de substâncias nas células ou entre células, presentes em tecido nasal de camundongos.
60	Putative uncharacterized protein	69			5,5/15	Não conhecida	
61	Putative uncharacterized protein	67			4,9/12	Não conhecida	
64	Putative uncharacterized protein	171			9,7/12		
65	Putative uncharacterized protein	56			8,0/18	Não conhecida	
65	Nucleoside diphosphate kinase B	55	Q01768	7,6/17,3		Metabolismo	Metabolismo energético. Síntese de nucleotídeo
66	Putative uncharacterized protein	60			7,6/20	Não conhecida	
67	Putative uncharacterized protein	60			7,4/21	Não conhecida	
69	Rho-related GTP-binding protein RhoC	77	Q62159	6,5/22,0	7,1/25	Processos celulares	Transdução de sinal
	Proteasome subunit alpha type-2	50	P49722	7,5/25,9		Metabolismo energético	Clivar peptídeos, possui atividade proteolítica, ATP-dependente
	Glutathione S-transferase P 1	36	P19157	8,0/23,6		Metabolismo	Metabolismo de aminoácidos, degradação de aminoácidos, e metabolismo de xenobióticos
70	Putative uncharacterized protein	89			7,3/24	Não conhecida	
71	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase C	121	P30412	7,6/22,7	7,7/22	Vias da informação	Relacionada com o dobramento de proteínas
	Putative uncharacterized protein	86				Não conhecida	
72	Amelogenin, X isoform	211	P63278	7,2/23,4	8,0/25	Estrutura e organização	Biomíneralização dos dentes, regula a formação dos cristais durante a fase secretória do desenvolvimento do esmalte dentário.
73	Putative uncharacterized protein	61			7,7/24	Não conhecida	
74	Amelogenin, X isoform	63	P63278	7,2/23,4	7,8/26	Estrutura e organização	Biomíneralização dos dentes, regula a formação dos cristais durante a fase secretória do desenvolvimento do esmalte dentário.

75	Glial fibrillary acidic protein	218	P03995	5,0/49,9	7,6/22	Estrutura e organização	Organização do citoesqueleto
	Putative uncharacterized protein	99	Q9CV72	8,3/59,5		Não conhecida	Estrutura e organização estrutural
76	Putative uncharacterized protein	77			8,3/25	Não conhecida	
77	Putative uncharacterized protein	42			7,6/28	Não conhecida	
79	Putative uncharacterized protein	52			7,0/27	Não conhecida	
80	Triosephosphate isomerase	102	P17751	5,4/32,1	6,9/27	Metabolismo	Biossíntese e degradação de carboidratos. Atua na glicogênese e glicólise. É uma fosfoproteína.
82	Putative uncharacterized protein	82			8,3/22	Não conhecida	
84	Serpin H1	72	P19324	8,8/46,5	7,8/28	Metabolismo	Metabolismo de enzimas. Chaperona. Resposta ao estresse. Biossíntese de colágeno, organização das fibrilas colagenas, maturação das proteínas, atividade proteolítica.
85	Putative uncharacterized protein	143			6,6/50	Não conhecida	
87	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase 48 kDa subunit	35	O54734	5,6/49,0	5,5/49	Processos celulares	Regulação celular
89	Putative uncharacterized protein	69			5,6/46	Não conhecida	
90	Putative uncharacterized protein	69			5,8/46	Não conhecida	
92	Cytosolic phospholipase A2 beta	39	P0C871	6,0/88	5,8/56	Metabolismo	Degrada e metaboliza lipídios
94	Tubulin alpha-1B chain	80	P05213	4,6/50,1	4,4/60	Estrutura e organização	Maior constituinte dos microtúbulos. Organização do citoesqueleto.
97	Putative uncharacterized protein	60			4,8/59	Não conhecida	
99	Keratin, type I cytoskeletal 10	67	P02535	4,7/57,0	5,1/59	Estrutura e organização	Organização do citoesqueleto

118	Annexin A2	278	P07356	7,8/38,6	7,5/40	Processos celulares	Transdução de sinal, ligação ao cálcio e fosfolípidos, regulação da organização das fibras colágenas,
	Argininosuccinate synthase	65	P16460	8,4/46,5		Metabolismo	Síntese de aminoácidos
	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	70	D2KHZ9	8,4/35,8		Processos celulares	
131	Putative uncharacterized protein	37			7,0/87	Não conhecida	
133	Putative uncharacterized protein	37			6,7/88	Não conhecida	
136	Fructose-bisphosphate aldolase	35	Q5FWB7	8,2/39,2	9,4/48	Metabolismo	Metabolismo de lipossacarídeos
137	Putative uncharacterized protein	60			4,2/26	Não conhecida	

Tabela 19. Proteínas identificadas com diferença de expressão ($p < 0,05$) entre os grupos 129P3/JC_MS e 129P3/JT_MS.

Spot	Proteína	Score	Uniprot ID	pI /PM (KDa) teo.	pI/PM (KDa) Exp.	Dif. Exp.	Processo biológico	Função Biológica
04	Peroxiredoxin-1	96	P35700	8,3/22,1	7,1/25	↑ 129P3/JT	Processos celulares	Age como antioxidante
	Peroxiredoxin-4	45	O08807	7,1/31,0		↑ 129P3/JT	Processos celulares	Age como antioxidante

Tabela 20. Proteínas pertencentes exclusivamente ao grupo 129P3/JC_MS quando comparado ao grupo 129P3/JT_MS

Spot	Proteína	Score	Uniprot ID	pI /PM (KDa) teo.	pI/PM (KDa) Exp.	Processo biológico	Função Biológica
83	Carbonic anhydrase 2	142	P00920	7,0/29,0	7,1/30	Transporte	Essencial para a reabsorção óssea e diferenciação dos osteoclastos. Transporte de dióxido de carbono CO ₂ .
	Carbonic anhydrase 1	41	P13634	6,9/28,3		Transporte	Transporte de íons, CO ₂ (dióxido de carbono) e íons metálicos (Zinco)
178	Putative uncharacterized protein	71			4,2/23	Não conhecida	

Tabela 21. Proteínas pertencentes exclusivamente ao grupo 129P3/JT_MS quando comparado ao grupo 129P3/JC_MS

<i>Spot</i>	<i>Proteína</i>	<i>Score</i>	<i>Uniprot ID</i>	<i>pI /PM (KDa) teo.</i>	<i>pI/PM (KDa) Exp.</i>	<i>Processo biológico</i>	<i>Função Biológica</i>
39	Putative uncharacterized protein	83			6,3/74	Não conhecida	
40	Putative uncharacterized protein	83			6,3/75	Não conhecida	
43	Vimentin	380	P20152	5,5/53	5,3/67	Estrutura e organização	Envolvida com a estabilização dos RNAm do colágeno tipo (CO1A1 e CO1A2)
75	Glial fibrillary acidic protein	218	P03995	5,0/49,9	7,6/22	Estrutura e organização	Organização do citoesqueleto
	Putative uncharacterized protein	99	Q9CV72	8,3/59,5		Não conhecida	Estrutura e organização estrutural
76	Putative uncharacterized protein	77			8,3/25	Não conhecida	
77	Putative uncharacterized protein	42			7,6/29	Não conhecida	
78	Transforming protein RhoA	82	P61589		7,1/18	Processos celulares	Transdução de sinal. Regulação do transporte de íons cálcio
	Nucleoside diphosphate kinase A	55	P15532	7,5/17,2		Metabolismo	Síntese de nucleotídeos-ATP
79	Putative uncharacterized protein	52			7,0/27	Não conhecida	
80	Triosephosphate isomerase	102	P17751	5,4/32,1	6,9/27	Metabolismo	Biossíntese e degradação de carboidratos. Atua na glicogênese e glicólise. É uma fosfoproteína.
84	Serpin H1	72	P19324	8,8/46,5	7,8/28	Metabolismo	Metabolismo de enzimas. Resposta ao estresse. Biossíntese e organização de colágeno e atividade proteolítica.
90	Putative uncharacterized protein	69			5,8/46	Não conhecida	
106	Keratin, type II cytoskeletal 5	209	Q922U2	7,9/61,7	6,5/70	Estrutura e organização	Organização do citoesqueleto
107	Neurofilament heavy polypeptide	37	P19246	5,5/116,9	6,2/69	Estrutura e organização	Organização do citoesqueleto. Constituinte do microtúbulos.
114	Putative uncharacterized protein	239			7,1/94		
	Elongation factor 2	239	P58252	6,8/95,3		Metabolismo	Biossíntese de proteínas
117	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	258	Q01853	4,8/89,3	5,0/94	Transporte	Envolvido na formação e transição do complexo de Golgi. Transporte de ácidos nucleicos, importante proteína do retículo endoplasmático (ER)

119	Alcohol dehydrogenase [NADP(+)]	81	Q9JH6	7,4/36,5	7,4/38	Metabolismo	Metabolismo de Xenofobico
	1,5-anhydro-D-fructose reductase	38	Q9DCT1	7,3/34,4		Metabolismo	Metabolismo energético
120	Tenascin-N	601	Q80Z71	5,0/173,0	5,1/111	Processos celulares	Transdução de sinal, regulação do crescimento e migração celular, adesão de células da matriz extracelular
160	Nucleoside diphosphate kinase B	117	Q01768	7,6/17,3	7,5/14	Metabolismo	Metabolismo energético
161	Putative uncharacterized protein	203			8,2/22	Não conhecida	
165	Putative uncharacterized protein	122			6,1/59	Não conhecida	
165	Aldehyde dehydrogenase	46	P47738	7,6/56,5		Processos celulares	Transdução de sinal
168	Keratin, type II cytoskeletal 5	402	Q922U2	7,9/61,7	5,5/62	Estrutura e organização	Organização do citoesqueleto
171	Putative uncharacterized protein	164			4,2/21	Não conhecida	
175	Aconitate hydratase, mitochondrial	90	Q99KI0	8,0/85,4	8,3/88		

Tabela 22 . Proteínas identificadas com diferença de expressão entre os grupos 129P3/JC_MM e 129P3/JT_MM.

<i>Spot</i>	Proteína	Score	Uniprot ID	pI /PM (KDa) teo.	pI/PM (KDa) Exp.	Dif. Exp.	Processo biológico	Função Biológica
02	Putative uncharacterized protein	417			8,2/11	↑129P3/JT	Não conhecida	

Tabela 23 . Proteínas pertencentes exclusivamente ao grupo 129P3/JC_MM quando comparado ao grupo 129P3/JT_MM

<i>Spot</i>	Proteína	Score	Uniprot ID	pI /PM (KDa) teo.	pI/PM (KDa) Exp.	Processo biológico	Função Biológica
138	Rho-related GTP-binding protein	34	Q62159	6,5/22,0	5,1/62	Processos celulares	Transdução de sinal
	Putative uncharacterized protein	53				Não conhecida	
139	Putative uncharacterized protein	333			7,7/25	Não conhecida	
140	Putative uncharacterized protein	57			5,4/76	Não conhecida	

Tabela 24 . Proteínas pertencentes exclusivamente ao grupo 129P3/JT_MM quando comparado ao grupo 129P3/JC_MM

<i>Spot</i>	Proteína	Score	Uniprot ID	pI /PM (KDa) teo.	pI/PM (KDa) Exp.	Processo biológico	Função Biológica
01	Putative uncharacterized protein	67			7,3/11	Não conhecida	
03	Actin, cytoplasmic 1	140	P60710	5,1/41,73	7,6/25	Estrutura e organização	Proteína envolvida na mobilidade celular
	Putative uncharacterized protein	48				Não conhecida	
04	Peroxiredoxin-1	96	P35700	8,3/22,1	7,1/25	Processos celulares	Age como antioxidante
	Peroxiredoxin-4	45	O08807	7,1/31,0		Processos celulares	Age como antioxidante
05	Annexin A5	1215	P48036	4,5/35,7	4,4/36	Processos celulares	Transdução de sinal. Regulação de liberação de cálcio dos reservatórios intracelulares
	Putative uncharacterized protein	151				Não conhecida	
	Actin, cytoplasmic 1	122	P60710	5,1/41,7		Estrutura e organização	Proteína envolvida na mobilidade celular
06	Putative uncharacterized protein	65			7,4/51	Não conhecida	
07	Pigment epithelium-derived factor	69	P97298	6,9/46,2	5,1/45	Estrutura e organização	
49	Heat shock cognate 71 kDa protein	37	P63017	5,1/70,8	5,5/75	Vias de informação	Atua como uma chaperona nas proteínas, regulação da transcrição, regulação do ciclo celular
61	Putative uncharacterized protein	67			4,9/12	Não conhecida	
108	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	114	P52480	7,5/57,8	8,4/66	Metabolismo	Metabolismo enzimático
	Periostin	388	Q62009	7,2/90,2		Processos celulares	Transdução de sinal. Importante função na mineralização da matriz extracelular

112	Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial	53	P26443	8,1/61,3	7,4/61		
	Annexin A2	278	P07356	7,8/38,6	7,5/40	Processos celulares	Transdução de sinal, ligação ao cálcio e fosfolípidos, regulação da organização das fibras colágenas,
118	Argininosuccinate synthase	65	P16460	8,4/46,5		Metabolismo	Síntese de aminoácidos
	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	70	D2KHZ9	8,4/35,8		Processos celulares	
	Rho-related GTP-binding protein RhoC	98	Q62159	6,5/22,0	7,8/23	Processos celulares	Transdução de sinal
121	Putative uncharacterized protein	69				Não conhecida	

5.2.3 Identificação das proteínas da matriz do esmalte

A correlação entre as propriedades das AMELs e o mecanismo pelo qual se desenvolve a fluorose dentária, tornou-se uma peça chave para o entendimento da sua patogenia (AOBA; FEJERSKOV, 2002; BRONCKERS, A.L.; LYARUU; DENBESTEN, 2009; BUZALAF et al., 2011; DRUMM; COLLINS, 1993; ROBINSON et al., 2004). O arranjo tridimensional do principal grupo de proteínas do esmalte, composto pelas AMELs, forma agregados de estruturas quaternárias chamadas *nanosferas*. Essa conformação permite que as AMLs se posicionem ao redor dos cristais, permitindo o direcionamento do seu crescimento e modulando a arquitetura da sua estrutura (BANSAL et al., 2012; DENBESTEN et al., 2002; DENBESTEN et al., 2011; FAN et al., 2011; FINCHAM et al., 1991; MORADIAN-OLDAK, 2001; PUGACH et al., 2010; RAVINDRANATH et al., 2004; TANIMOTO et al., 2008; YANG et al., 2011). Durante o estágio de maturação do esmalte, a remoção ordenada das proteínas, promove o crescimento simultâneo de uma superfície mineralizada. Desse modo, ocorre o alongamento dos cristais, evento este atribuído às AMELs em função da sua alta afinidade de ligação à superfície mineral do esmalte e a sua presença em maior quantidade em relação às outras proteínas ENAMs (BANSAL et al., 2012; LACRUZ et al., 2012a; LACRUZ et al., 2010b; LACRUZ et al., 2011; RAUTH et al., 2009; ROBINSON et al., 1998; SIMMER; HU, 2001; SIMMER et al., 2012; SMITH, 1998). A ocorrência de qualquer interferência durante esse processo, resulta em distúrbios do desenvolvimento do esmalte, dentre os quais se destaca a fluorose dentária.

Diversas hipóteses têm sido associadas à patogenia da fluorose dentária. Em síntese, destacam-se três mecanismos bastante discutidos até os dias atuais (AOBA; FEJERSKOV, 2002; BRONCKERS; LYARUU; DENBESTEN, 2009; DENBESTEN; LI, 2011). O primeiro mecanismo envolvido seria devido às alterações funcionais observadas nos ameloblastos, que afetariam diretamente suas propriedades de síntese e degradação da matriz. O segundo mecanismo estaria relacionado à inibição ou diminuição da atividade das enzimas proteolíticas residentes na matriz do esmalte (MMP20 e KLK4) (BARTLETT; SIMMER, 1999; BARTLETT et al., 2011; BARTLETT; SMITH, 2013; BRONCKERS; LYARUU; DENBESTEN, 2009; DENBESTEN; LI, 2011; DENBESTEN; HEFFERNAN, 1989; DENBESTEN et al., 2002; ROBINSON et al., 2004; WEI et al., 2013). E por último, o F seria incorporado à estrutura do cristal de hidroxiapatita promovendo uma ligação mais estável entre a matriz inorgânica e a orgânica, tornando a degradação das proteínas pelas enzimas proteolítica mais difícil (DENBESTEN et al., 2011; TANIMOTO et al., 2008; ZHU

et al., 2011). A falta de remoção das proteínas do esmalte pode ser considerada como o principal responsável pela diminuição da quantidade e do índice de nucleação dos cristais de hidroxiapatita do esmalte (AOBA; FEJERSKOV, 2002; AOBA et al., 1992; DENBESTEN; LI, 2011). Essa hipótese foi verificada em um estudo *in vitro* que avaliou o potencial de inibição do crescimento dos cristais pelas proteínas da matriz do esmalte (AOBA et al., 1987). Notou-se que uma interferência na degradação dessas proteínas poderia estar vinculada à permanência prolongada das mesmas, ou seja, a um retardo na degradação e remoção, e, conseqüentemente, à ocorrência de um distúrbio na mineralização do esmalte. Como esperado, no presente estudo, a AMEL, foi identificada, na fase de maturação, exclusivamente na linhagem A/J tratada com 50 mg/L de F, quando comparada à linhagem 129P3/J submetida ao mesmo tratamento (tabela 11). Estes dados estão de acordo com a literatura, que relata retenção de AMELs no estágio de maturação do esmalte quando há fluorose dentária (DENBESTEN; LI, 2011; DENBESTEN et al., 2011; MORADIAN-OLDAK, 2012; ZHU et al., 2011). Também confirmam a maior susceptibilidade genética à fluorose dentária da linhagem A/J e a resistência da linhagem 129P3/J, como relatado em estudos prévios (CARVALHO et al., 2009; EVERETT et al., 2002; EVERETT et al., 2009). Tem sido relatado que a hidrólise reduzida das AMELs no esmalte com fluorose pode ser parcialmente causada por um aumento na concentração de apatita fluoretada, o que contribuiria para o fenótipo de matriz hipomineralizada observado no esmalte com fluorose (DENBESTEN et al., 2011; TANIMOTO et al., 2008). Entretanto, no presente estudo, as concentrações de F no esmalte dos animais da linhagem 129P3/J tratados com 50 mg/L F foram significativamente maiores que aquelas observadas nos animais da linhagem A/J submetidos ao mesmo tratamento, o que indica que há outros mecanismos envolvidos na susceptibilidade genética à fluorose dentária, além daquele descrito por Denbesten et al. (2011). Em adição, Everett et al. (EVERETT et al., 2009), detectaram *loci* de características quantitativas (QTL) associados à fluorose dentária nos cromossomos 2 e 11 dos camundongos A/J e 129P3/J, mas não no cromossomo X, onde se encontra a AMEL, o que sugere um papel pequeno desta proteína na susceptibilidade/resistência à fluorose dentária. Deve ser ainda mencionado que no presente estudo não houve alteração na expressão de AMEL entre as linhagens e nem entre os grupos controle e tratado no estágio de secreção do esmalte, o que está de acordo com estudos que relatam a ausência de efeito do F na secreção de AMEL (DENBESTEN, 1986). Em outras palavras, pode-se dizer que a presença de AMEL apenas nos animais tratados com F da linhagem A/J e não nos da linhagem 129P3/J, no estágio de maturação do esmalte, é uma consequência dos eventos moleculares que levam à fluorose dentária, e não a sua causa.

No esmalte, a interface mineral-orgânica é muito importante para guiar o crescimento dos cristais de apatita, sendo o papel das AMELs fundamental, uma vez que estas proteínas formam nanosferas que recobrem a superfície do cristal seletivamente na fase de secreção da amelogênese e atuam como moléculas espaçadoras entre os cristais (FINCHAM et al., 1995). Esta cobertura guia o crescimento do cristal tornando-o preferencial em comprimento (eixo *c*), prevenindo sua fusão lateral. O papel da interface mineral-orgânica no mecanismo da fluorose dentária tem sido recentemente enfatizado num novo modelo proposto para explicar o desenvolvimento da fluorose dentária. Segundo este modelo, o F acelera o crescimento do cristal, resultando numa rápida deposição mineral, o que aumenta muito a produção de prótons (para cada apatita formada, 8 prótons são liberados), que não podem mais ser tamponados pelas AMELs. Em pH ácido, as nanosferas de AMELs se desagregam e se destacam da superfície do cristal, ao mesmo tempo em que novas moléculas de AMELs não são capazes de formar nanosferas, permanecendo monoméricas. Isto faz o controle preferencial de crescimento do cristal ser perdido, ou seja, os cristais crescem lateralmente, tornando-se mais largos, levando às características conhecidas da fluorose dentária (BRONCKERS; LYARUU; DENBESTEN, 2009). Tem sido relatado que os cristais de apatita do tecido ósseo dos animais da linhagem 129P3/J são significativamente mais estreitos e curtos que aqueles da linhagem A/J, mesmo sem tratamento com F, sugerindo crescimento mais lento do cristal (MOUSNY et al., 2008) o que também foi observado para os cristais do esmalte, empregando microscopia de força atômica (dados não publicados). Este crescimento mais lento, permitiria uma ação tamponante mais apropriada das amelogeninas, que no pH adequado poderiam permanecer aderidas à superfície do cristal, guinando seu crescimento preferencialmente em altura.

Outra possibilidade seria haver a ação de outra proteína tamponante, que poderia compensar a grande geração de prótons causada pela presença de maiores quantidades de F no esmalte dos animais da linhagem 129P3/J. No presente estudo, a *carbonic anhydrase 2* foi encontrada exclusivamente no estágio de secreção dos animais da linhagem 129P3/J não tratados com F, quando comparados àqueles da linhagem A/J na mesma condição (tabela 4). Esta enzima tem um importante papel na homeostase do pH durante o estágio de secreção do esmalte (LACRUZ et al., 2010a).

As mudanças observadas na estrutura do esmalte têm sido associadas às injúrias que acometem a sua principal célula formadora, os ameloblastos, e mediante esse aspecto, estudos têm atribuído ao F alterações no retículo endoplasmático (RE) dessas células (KUBOTA et al., 2005; SHARMA; TSUCHIYA; BARTLETT, 2008; SIERANT; BARTLETT, 2012; WEI

et al., 2013). A partir da premissa de que as pequenas vesículas de transporte que se movem para dentro e para fora da membrana plasmática na endocitose e exocitose são parte de um sistema dinâmico de membranas intracelulares que inclui o RE, o complexo de Golgi, o envelope nuclear e uma variedade de vesículas pequenas como os lisossomos e peroxissomos, buscou-se o conhecimento acerca dos efeitos do F nessas estruturas durante a amelogênese. O RE é a organela responsável pela organização da síntese de proteínas e lipídeos nas células eucarióticas (LEHNINGER, 2002). As proteínas e proteases da matriz são sintetizadas e modificadas no RE dos ameloblastos. Devido à sua função de dobramento e transporte das proteínas, o RE é rico em chaperonas moleculares, proteínas assistentes que interagem com polipeptídios parcialmente enovelados, facilitando as vias corretas de enovelamento ou fornecendo microambientes nos quais o enovelamento possa ocorrer (MA; HENDERSHOT, 2004; ORRENIUS; ZHIVOTOVSKY; NICOTERA, 2003; RIZZUTO; DUCHEN; POZZAN, 2004; SCHRODER; KAUFMAN, 2005). Muitos distúrbios, incluindo estímulos bioquímicos e fisiológicos podem causar acúmulo de proteínas não dobradas ou dobradas inadequadamente no RE, uma condição conhecida como estresse do RE. Para resolver o acúmulo dessas proteínas deformadas, o RE desencadeia a *unfolded protein response (UPR)* no intuito de manter a homeostase do RE (RON; WALTER, 2007). Existem três proteínas de sinalização transmembrana no RE de mamíferos, *inositrequiring quinase 1a (IRE1a)*, *PEK-like kinase ER (PERK)*, e *activating transcription fator 6 (ATF6)* (RAO; BREDESEN, 2004; RON; WALTER, 2007; SCHRODER; KAUFMAN, 2005; SHEN; ZHANG; KAUFMAN, 2004), as quais detectam a presença de proteínas desdobradas. Normalmente, estas proteínas transmembrana do RE estão ligadas à chaperona do RE BiP/Grp78. Quando ocorre acúmulo de proteínas deformadas, a BiP/Grp78 é dissociada destas três proteínas transmembrana sinalizadoras, iniciando a UPR. A chaperona BiP/Grp78 é um regulador da homeostase do RE, e o aumento da sua regulação é amplamente utilizado como um marcador do estresse do RE diante uma condição patológica (BERTOLOTTI et al., 2000; LEE, 2001, 2007). Este último processo também resulta na produção de *X-box-binding protein-1 (XBP-1)*, um fator de transcrição que induz a expressão de genes envolvidos no transporte reverso de proteínas deformadas do RE para o citosol, restaurando o dobramento de proteínas ou degradando as proteínas não dobradas (RAO; BREDESEN, 2004). Estudos têm demonstrado que o F induz estresse no RE de ameloblastos, interferindo na síntese e secreção das proteínas da matriz do esmalte em formação comprometendo sua função durante a formação do esmalte (KUBOTA et al., 2005; SHARMA; TSUCHIYA; BARTLETT, 2008). No presente estudo, foi identificada a *transitional endoplasmic reticulum ATPase (TERA)* em ambas as linhagens no

grupo tratado com 50 mg/L de F no estágio de secreção do esmalte (A/JT_MS e 129T_MS), mas não nos grupos controle (tabelas 15 para A/J e 21 para 129P3/J). Este fato está de acordo com a literatura que demonstrou o efeito do F sobre o RE. A expressão dessa proteína nos grupos tratados, confirma uma possível resposta de estresse no RE durante o estágio de secreção da matriz do esmalte. No entanto, não foi observada diferença de expressão entre as linhagens.

Outra classe de proteínas envolvidas no enovelamento são as chaperonas, que interagem com polipeptídios parcialmente enovelados, facilitando as vias corretas de enovelamento ou fornecendo microambientes nos quais o enovelamento possa ocorrer. Além disso, também impedem o enovelamento de proteínas que devem permanecer desenoveladas até serem levadas através da membrana (NELSON; COX, 2002). Foi observado que duas proteínas que atuam como chaperonas estavam presentes em ambas as linhagens e tratamentos no estágio de secreção do esmalte [*Heat shock 75-kDa protein (Hsp 75)* e *Heat shock 71-kDa protein (Hsp 71)*]. No entanto, no estágio de maturação, a *Hsp 75* não estava presente em nenhum grupo, enquanto que, a *Hsp71* só não estava presente nos animais 129P3/J controle (tabelas 8 e 24). Foi reportado aumento na expressão de uma proteína da mesma família, a *Heat shock 70-kDa protein (Hsp 70)*, em cultura de osteoblastos expostos ao F, sugerindo um aumento da reação de dobramento oxidativo mediante exposição ao fluoreto (XU; JING; LI, 2008). É bem conhecido que toda proteína depende do dobramento oxidativo para a sua maturação e função, o que depende de uma reação redox e uma consequência do dobramento oxidativo é a produção de espécies reativas de oxigênio (TU; WEISSMAN, 2004). Autores também relataram em sua revisão que a *Hsp 70* é rapidamente ativada durante o processo de resposta celular ao estresse do meio ambiente, sugerindo que proteínas desta família seriam um possível mediador contra a intoxicação crônica pelo F (BARBIER; ARREOLA-MENDOZA; DEL RAZO, 2010). Expressão aumentada da *Hsp 70* também foi relatada em cultura de células tumorais de cérebro tratadas com F (NaF 5 mM por 2 h) (CHENG et al., 1998). A identificação das duas formas de chaperonas no presente estudo denota que essas proteínas foram ativadas na presença de F para diminuir os danos causados por este íon. Outra *heat shock protein* com alteração de expressão no presente estudo foi a *HSP47 (SERPINH1)*. Esta proteína estava presente no estágio de secreção nos animais 129P3/J tratados com F, mas não nos animais controle da mesma linhagem (Tabela 21) e nem nos animais da linhagem A/J controle ou tratados com F (Tabela 7). Trata-se de chaperona residente do retículo endoplasmático essencial para a montagem da hélice tríplice de moléculas de procolágeno (WIDMER et al., 2012), cuja expressão está aumentada em

condições de *heat shock* (NAGATA et al., 1986). A biossíntese do colágeno é um processo complexo de múltiplos estágios que inclui eventos extra e intracelulares acompanhados por numerosas modificações pós-tradução. Uma ou mais cadeias- α de pró-colágeno distintas são translocadas para o retículo endoplasmático, onde o dobramento tem início, assistido por várias chaperonas ou proteínas *heat shock* (HSPs), acompanhado por várias modificações pós-tradução. Após a trimerização inicial, a hélice tríplice de colágeno se dobra de maneira similar a um zíper do C para o N terminal dependendo da hidroxilação prévia da prolina. Um grande número de enzimas modificadoras, como a BiP/Grp78 e proteína dissulfeto isomerase estão envolvidas neste processo (WIDMER et al., 2012). Diferentemente de outras HSPs em geral e outras proteínas residentes do retículo endoplasmático envolvidas no dobramento e maturação do colágeno (como BiP/Grp78 e proteína dissulfeto isomerase), a HSP47 não possui outras proteínas alvo. Ela é expressa em todas as células que sintetizam colágeno e os níveis de expressão constitutiva estão intimamente correlacionados com as quantidades de colágeno que estão sendo sintetizadas na célula correspondente. Portanto, níveis elevados de expressão de HSP47 são observados numa variedade de modelos de fibroses (KURKINEN et al., 1984; NAGATA et al., 1986; TAGUCHI & RAZZAQUE, 2007; TAKECHI et al., 1992). A HSP47 se liga a colágenos pelo menos dos tipos I-IV, reconhecendo uma arginina na posição Yaa de um *triplet* Xaa-Yaa-Gly e, em contraste com outras chaperonas, a HSP47 reconhece preferencialmente a conformação dobrada de hélice tríplice do seu alvo (WIDMER et al., 2012; ONO et al., 2012). A liberação do colágeno a partir da HSP47 acontece no *cis*-Golgi ou compartimento intermediário retículo endoplasmático-Golgi e é provavelmente induzida pelo pH mais baixo do Golgi comparado ao retículo endoplasmático (6,1 *versus* 7,2) acompanhada por um rearranjo conformacional reversível, induzido pelo pH, da HSP47 (THOMSON & ANANTHANARAYANAN, 2000; SAGA et al., 1987). A HSP47 livre é transportada de volta rapidamente do Golgi para o retículo endoplasmático pelos receptores KDEL, que reconhecem o motivo RDEL na extremidade C terminal da chaperona (WIDMER et al., 2012). No presente estudo, a presença de HSP47 no estágio de maturação nos animais 129P3/J tratados com F, mas não nos animais A/J tratados, e nem nos animais 129P3/J controle, poderia indicar uma formação mais apropriada da hélice tríplice de colágeno nos animais 129P3/J tratados. Esta formação apropriada do colágeno permitiria que esta proteína fosse degradada no estágio de maturação, o que é condizente com a ausência de COL1A1 nos animais 129P3/J tratados com F neste estágio, mas não nos animais A/J, onde a COL1A1 estava presente no estágio de maturação, mediante tratamento com F (Tabela 11). Estudos

futuros deveriam estudar a expressão de HSP47 e colágeno, bem como sua colocalização, nestas duas linhagens de camundongos, a fim de confirmar estes achados.

As peroxirredoxinas (PRDX) têm a função de proteção celular contra estresse oxidativo, além de modular as vias de sinalização intracelular. Catalisam a redução de H_2O_2 e hidroxiperoxido em água e álcool (HOFMANN; HECHT; FLOHE, 2002). No presente estudo, observou-se que a *Perodoxiredoxin-2 mitochondrial* foi identificada, no estágio de secreção, exclusivamente nos animais da linhagem 129P3/J (tanto controle quanto tratados), mas não nos animais da linhagem A/J (tabelas 4 e 7 para controle e tratado, respectivamente), indicando possivelmente uma maior proteção dos animais da linhagem 129P3/J, independentemente do tratamento com F, contra o estresse oxidativo. Este efeito pode ser ainda reforçado pelo aumento de expressão das isoformas 1 e 4 desta enzima nos animais controle da linhagem 129P3/J, quando comparados aos da linhagem A/J, também no estágio de secreção (tabela 2). Entretanto, mediante tratamento com F, foi observado um efeito inverso, ou seja, aumento da expressão das isoformas 1 e 4 nos animais A/J quando comparados aos 129P3/J (tabela 5), o que indica provavelmente um maior estresse oxidativo induzido pelo F nos animais A/J, o que poderia estar levando a uma tentativa do organismo se proteger contra este estresse, aumentando a expressão de proteínas antioxidantes. Alteração em enzimas envolvidas no equilíbrio oxidativo podem ter ligação com o estresse oxidativo induzido pelo F (BARBIER; ARREOLA-MENDOZA; DEL RAZO, 2010; SHANTHAKUMARI; SRINIVASALU; SUBRAMANIAN, 2004; STIRNIMANN; KESSEBOHM; LAUTERBURG, 2010; ZHAN et al., 2006).

As proteínas *Alpha-enolase*, *Beta-enolase* e *Gamma-enolase*, pertencem à família da *Enolase*, na qual já foram identificados mais de 20 membros (LUKKA et al., 2012). A *Enolase* é considerada uma proteína multifuncional, pois além de ser uma enzima chave na atividade glicolítica, pode servir como um receptor de plasminogênio na superfície de células hematopoiéticas, epiteliais e endoteliais e, conseqüentemente, desempenhar um papel importante no sistema intravascular e pericelular. Em adição, a *Enolase* pode ser capaz de atuar como uma *Heat shock protein* e ligar estruturas do citoesqueleto e cromatina, indicando assim que a *Enolase* pode desempenhar um papel crucial na transcrição gênica e processos fisiopatológicos (PANCHOLI, 2001). No presente estudo, a *Beta-enolase* foi identificada em ambas as linhagens. Entretanto, no estágio de secreção, ela estava presente em todos os animais 129P3/J, independentemente do tratamento com F, enquanto que, nos animais A/J estava presente exclusivamente quando houve tratamento com F (tabela 15), o que também ocorreu para os animais A/J no estágio de maturação (tabela 18). Entretanto, nos 129P3/J no

estágio de maturação, a *Beta-enolase* não estava presente. O fato de a *Beta-enolase* ter sido detectada nos animais susceptíveis ao F sempre quando houve tratamento com este íon sugere que a enzima poderia estar atuando como uma *Heat shock protein*, desempenhando papel crucial para diminuir os danos causados pela exposição ao F.

Importantes proteínas relacionadas ao metabolismo, foram identificadas na matriz do esmalte. A *Fructose-bisphosphate aldolase B* é uma enzima que participa da fase preparatória da via glicolítica, clivando a frutose-1,6-bifosfato em gliceraldeído-3-fosfato e diidroxiacetona fosfato (NELSON; COX, 2002). De acordo com Kobayashi et al. (KOBAYASHI et al., 2009) a presença e o aumento de expressão dessa proteína poderia ser um sinal de início de alterações metabólicas das células. O F é capaz de inibir a enolase e esse aumento da expressão da aldolase (*up-stream* em relação à enolase na via glicolítica) poderia ser uma tentativa da célula de garantir a eficiência dessa via (KOBAYASHI et al., 2009; WARBURG; CHRISTIAN, 1941). No presente estudo esta enzima foi indentificada no grupo A/JT_MM, não sendo identificada na linhagem 129P3/J, indicando uma tentativa da célula em combater as alterações metabólicas causadas pelo F. A *Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta, mitochondrial* catalisa a conversão do piruvato em acetil-CoA e CO₂, regulando, desta maneira, o fluxo metabólico (NELSON; COX, 2002). Leite (2010) encontrou alteração em proteína semelhante, a *Pyruvate dehydrogenase complex component E2* (PDC-E2). Foi observada uma redução significativa e dose-dependente da atividade da PDC-E2 nos rins de ratos tratados com doses agudas de F, como no presente estudo, onde, no estágio de secreção, foi observada um diminuição na expressão da enzima nos animais A/J tratados com F, quando comparados com animais controle da mesma linhagem (tabela 13).

A *ATP synthase mitochondrial* é uma ATPase composta por dois domínios estruturais do tipo F (F₀F₁). A porção F₀ é um complexo integral de membrana localizado na membrana interna mitocondrial, envolvido na translocação dos prótons provenientes da cadeia respiratória. Já a porção F₁ é um complexo extramembranar voltado para a matriz mitocondrial, formado por 9 subunidades de 5 tipos diferentes, com composição $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$ (COLLINSON et al., 1994; NELSON; COX, 2002; WALKER et al., 1985). As subunidades α e β são estruturalmente similares, dispostas de modo a formar uma estrutura similar aos gomos de uma laranja. Cada subunidade apresenta 3 domínios: um N-terminal pequeno, um domínio de ligação a nucleotídeo e um domínio C-terminal helicoidal. Porém, apenas a subunidade β apresenta mudanças conformacionais, designadas β -vazia, β -ADP e β -ATP, sendo essas mudanças cruciais para a síntese de ATP, uma vez que as unidades α e β giram, catalisando, assim a formação do ATP. O mecanismo proposto é que uma subunidade β

começa na conformação β -ADP, que tem afinidade pelo ADP e Pi presente no meio, que quando se ligam, mudam a conformação para β -ATP, o qual, por sua vez, liga firmemente e estabiliza o ATP, promovendo assim o equilíbrio do ADP+Pi com o ATP na superfície da enzima. Por fim, a subunidade muda para a conformação β -vazia, que possui uma baixa afinidade ao ATP o qual então deixa a superfície da enzima. O giro das subunidades é impulsionado pelo fluxo de prótons que passam através de F_0 (LEYVA; BIANCHET; AMZEL, 2003; NELSON; COX, 2002). No presente trabalho, foi identificada a *ATP synthase subunit beta, mitochondrial*, que, no estágio de maturação, estava ausente nos animais A/J controle, quando comparados com animais da mesma linhagem tratados com F (tabela 18), embora na literatura seja relatada redução na produção de ATP (BARBIER; ARREOLA-MENDOZA; DEL RAZO, 2010) e na expressão de ATP sintase (LEITE, 2010; PEREIRA, 2011).

As proteínas 14-3-3 são uma família de proteínas ácidas altamente conservadas, compostas por 7 isoformas em mamíferos, que podem interagir com mais de 200 proteínas através de ligações a resíduos de fosfoserina e fosfotreonina. Sua natureza dimérica permite que elas atuem como pontes intermoleculares, colocalizando proteínas de maneira dependente de fosforilação (FORREST; GABRIELLI, 2001). Agem em vias de sinalização, estando envolvidas no controle ciclo de celular, crescimento celular, diferenciação, sobrevivência, apoptose, migração e propagação (MHAWECH, 2005). Foram identificadas neste trabalho 3 isoformas desta proteína: *14-3-3 protein zeta/delta*, *14-3-3 protein épsilon* e *14-3-3 protein gamma*. Sabe-se que durante a interfase, duas isoformas 14-3-3 ζ e ϵ (*14-3-3 protein zeta/delta* e *14-3-3 protein épsilon*, respectivamente) ligam-se à Cdc25C, que é um membro da família de proteínas fosfatases Cdc25, as quais têm a função de avançar o ciclo celular da fase G2 para fase M. A ligação destas isoformas a esta fosfatase resultaria na retirada desta proteína do citoplasma, levando à sua desativação e impedindo a ativação prematura do ciclo celular. Assim, a ausência destas isoformas poderia provocar esta ativação prematura (FORREST; GABRIELLI, 2001; MHAWECH, 2005), levando à proliferação celular, que pode ocorrer na presença de F (BARBIER; ARREOLA-MENDOZA; DEL RAZO, 2010). Já a isoforma *14-3-3 beta* está ligada ao controle de migração e propagação celular através da regulação de integrinas, uma família de glicoproteínas de superfície que ligam a matriz extracelular com o citoesqueleto de actina. A superexpressão desta isoforma beta estimula a migração, sobrevivência e a propagação celular (MHAWECH, 2005). Um dado adicional importante é que a *14-3-3 protein gama*, em conjunto com a *beta* e a *épsilon*, está envolvida na regulação do ciclo celular via complexo TSC1/TSC2 (esclerose tuberosa ½), que

desempenha um papel importante em inibir o crescimento celular e em controlar o tamanho da célula através da regulação na transição da fase G1 a fase S (HENGSTSCHLAGER et al., 2003). Assim, alterações nestas proteínas poderiam provocar alterações neste controle. Tem sido descrito na literatura que ameloblastos e órgãos do esmalte expostos a níveis milimolares de F, *in vitro*, mostram alterações na sua estrutura, redução da síntese e secreção de proteínas, alteração na proliferação celular, indução da apoptose, estresse celular, alteração dos filamentos de actina do citoesqueleto, dentre outras (BRONCKERS; LYARUU; DENBESTEN, 2009; DENBESTEN; LI, 2011; DENBESTEN et al., 2002; KUBOTA et al., 2005; LI et al., 2005; ROBINSON et al., 2004; SHARMA; TSUCHIYA; BARTLETT, 2008; SHARMA et al., 2010; SMITH; NANCI; DENBESTEN, 1993). No presente estudo, as 3 isoformas desta proteína encontradas apresentaram o mesmo perfil de expressão, ou seja, no estágio de secreção, as proteínas se encontravam ausentes na linhagem A/J controle, quando comparada à 129P3/J controle (tabela 4), enquanto que, no estágio de maturação as proteínas se encontravam ausentes nos animais 129P3/J tratados com F, quando comparados aos A/J também tratados (tabela 11).

Os dois estágios predominantes de desenvolvimento do esmalte são os estágios de secreção e de maturação. O estágio secretor é quando os ameloblastos do órgão de esmalte desenvolvem o processo de Tomes em suas extremidades apicais e começam a mover-se lateralmente de modo a formar o esmalte bastão e interbastão. Estes prolongamentos (processos de Tomes) são retraídos nos ameloblastos do estágio de transição-maturação do esmalte. Significativamente, as junções aderentes mantêm as células unidas ou ancoram células à matriz extracelular (NISHIKAWA et al., 1990). Estas junções também são importantes na sinalização celular. Seus componentes citoplasmáticos podem interagir com o citoesqueleto desencadeando mudanças na forma celular e na mobilidade celular, podem interagir com algumas moléculas de supressão tumoral e podem agir como fatores de transcrição nuclear ou coativadores. Em certos casos, a perda de contato célula-célula ou célula-matriz pode levar a apoptose dos ameloblastos, enquanto em outras, a perda de contato pode levar à perda da polaridade e de diferenciação celular ou à proliferação celular desregulada (NANCI, 2008). Em junções aderentes célula-célula, as principais proteínas transmembrana são membros da família *cadherin*. As caderinas são proteínas transmembrana, dependentes de ion cálcio, que apresentam domínios extracelulares que fornecem contatos adesivos importantes entre as células vizinhas. Os domínios extracelulares se conectam homotipicamente com caderinas de células adjacentes, e os domínios intracelulares das caderinas, estão ligadas à actina do citoesqueleto e pelas *catenina*. As catenina são proteínas

adaptadoras citoplasmáticas, que interagem com o domínio citoplasmático da molécula de caderina transmembrana, com o citoesqueleto e com várias outras proteínas, incluindo quinases e moléculas de supressão tumoral que estão associadas às junções aderentes. Os ameloblastos expressam as E-, N- e P-caderinas, bem como alfa e β -catenina e p120-catenina (P120), durante o desenvolvimento do esmalte dentário (BARTLETT et al., 2010; FAUSSER et al., 1998; HEYMANN et al., 2002; PALACIOS et al., 1995). Uma das maiores e mais importantes via de sinalização das junções aderentes envolve a regulação da β -catenina, o que pode atuar tanto como uma proteína estrutural nas junções célula-célula ou de um fator de transcrição nos núcleos celulares (MUNSHI; STACK, 2006). Quando as MMPs degradam um domínio extracelular da caderina, β -catenina é removida da sua posição próxima da membrana celular e na maioria dos casos será transportada para o núcleo da célula, assim, promovendo a migração de células, a invasão de células e a proliferação celular (LOCHTER et al., 1997; LYNCH et al., 2010; MCGUIRE; LI; PARKS, 2003). No presente estudo foram identificadas a *alfa catenin* em ambas linhagens e tratamentos e também ambos estágios de desenvolvimento.

Os proteossomos são complexos de diversas proteases que levam proteínas marcadas para a destruição pela união com a ubiquitina. As moléculas de ubiquitina ligam-se a um resíduo de lisina da proteína a ser degradada e outras moléculas de ubiquitina se prendem à primeira, formando assim um complexo que é reconhecido pela partícula reguladora, a qual tem uma ATPase que usa a energia do ATP para desenrolar a proteína e introduzi-la no proteossomo, onde a mesma será quebrada em peptídeos com 8 aminoácidos. Essa degradação se faz necessária para que o organismo possa remover excessos de enzimas e outras proteínas após o desenvolvimento da sua função. Além disso, os proteossomos também destroem proteínas com defeitos estruturais e as codificadas por vírus (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). No presente trabalho, foi identificada com diferença de expressão uma proteína associada a proteossomos, a *Proteosome subunit alpha type-2*. A diferença observada entre as linhagens para esta proteína foi que, no estágio de maturação, como observado para várias outras proteínas identificadas, quando foi realizado tratamento com F, esta proteína se encontrava presente exclusivamente nos animais da linhagem A/J e não nos 129P3/J (tabela11). Ge et al. (2011) também observaram aumento de expressão desta proteína no cérebro de ratos exposto a altas doses de F. Os autores sugeriram que a elevada expressão desta poderia resultar na destruição da coordenação entre o proteossoma e a ubiquitina, e este aumento de função do proteossoma poderia aumentar a decomposição de proteínas normais

sem a combinação com a ubiquitina devido a um desalinhamento funcional entre o proteossoma e a ubiquitina.

As diversas células, tecidos e órgãos que compõem a cavidade bucal e estruturas relacionadas são componentes complexos que exibem desenvolvimento singular e característicos. As células possuem um citoesqueleto que fornece um arcabouço estrutural para as células, facilita o transporte intracelular, sustenta as junções celulares e, principalmente está envolvido na mobilidade celular. O citoesqueleto consiste em várias redes de bastões estruturais altamente organizados. A rede pode ser formada por três tipos de bastões, a saber: filamentos intermediários formados nos tecidos mesenquimais pela vimentina, microfilamentos formados pela actina ou microtúbulos formados pela tubulina (NANCI, 2008). Todas essas proteínas estão relacionadas à estrutura ou organização dos filamentos de actina no citoesqueleto, o que está intimamente ligado à movimentação celular, a qual pode ocorrer pelo arranjo do citoesqueleto de actina. Estes filamentos são componentes estruturais celulares que têm como papel chave determinar a forma e a mobilidade celular. A polimerização e despolimerização destas fibras de actina estão envolvidas na regulação da migração celular (ZIGMOND, 1996). Em adição, heterodímeros de tubulina formados de α - e β -tubulina (cada uma com cerca de 50 kDa) são os componentes estruturais básicos que constituem os microtúbulos, com aproximadamente 25 nm de diâmetro que radiam a partir do centro organizador de microtúbulos localizado no centróssomo no citoplasma de células em interfase. Os microtúbulos estão envolvidos em vários processos celulares, que também incluem movimentação celular, transporte intracelular e divisão celular (JANKE; KNEUSSEL, 2010; SELTMANN et al., 2013). Neste trabalho foi observado que proteínas que estão relacionadas a estas atividades tiveram sua expressão alterada, o que possivelmente provocou alterações nestes mecanismos. Um estudo relatou que o F pode provocar alterações no citoesqueleto, bem como na mobilidade e proliferação celular (BARBIER; ARREOLA-MENDOZA; DEL RAZO, 2010). No estágio de secreção, para os animais não tratados com F a *Miosyn Light chain 1/3 skeletal muscle isoform* foi encontrada exclusivamente nos animais da linhagem 129P3/J (tabela 4), enquanto que a *Actin cytoplasmic 1* e a *Keratin type II cytoskeletal 14* estavam superexpressas nos animais 129P3/J, comparados aos A/J (tabela 2). Já a *Keratin type II cytoskeletal 5* e a *Keratin type 1 cytoskeletal 14* foram exclusivas dos animais A/J (tabela 3). O tratamento com F levou a uma subexpressão da *Actin cytoplasmic 1* nos animais 129P3/J quando comparados aos A/J (tabela 5). Ainda mediante tratamento com F, a *Keratin type II cytoskeletal 5* foi identificada exclusivamente nos animais 129P3/J, em dois *spots* distintos (tabela 7). Quando se considera o estágio de maturação, nos animais

controle, algumas proteínas estavam presente apenas na linhagem A/J, como a *Actin cytoplasmic 1*, a *Vimentin*, e a *Tubulin alpha-1B chain* (tabela 8), enquanto que, a *Pigment epithelial-derived factor* e a *Cathenin alpha-1* estavam subexpressas nos animais 129P3/J, quando comparados aos A/J (tabela 10). Já para os animais tratados com F, as seguintes proteínas foram identificadas exclusivamente nos animais da linhagem A/J: *Actin cytoplasmic 1*, *Pigment epithelial-derived factor*, *Vimentin*, *Keratin type I cytoskeletal 14*, *Gamma actin-like protein*, *Glial fibrillary acidic protein*, *Tubulin alpha-1B chain* e *Keratin type I cytoskeletal 10* (tabela 11). Assim, pode-se dizer que diferenças intrínsecas no perfil de expressão de proteínas relacionadas ao citoesqueleto existem entre as linhagens de camundongos estudadas, e estas diferenças parecem ser moduladas pelo tratamento com F. Considerando as diferenças entre os tratamentos com F, para a mesma linhagem de animais, várias diferenças de expressão também foram detectadas (tabelas 13, 16, 19 e 22), com destaque para o aumento na expressão, na matriz de secreção, da *Catenin alpha-1* nos animais A/J tratados com F quando comparados com os respectivos controle (tabela 13). As caderinas são proteínas transmembrana com domínios extracelulares que dão contato adesivo entre as células, enquanto que seu domínio intracelular interage diretamente com uma molécula de β - ou γ -catenina (NATHKE et al., 1994; PIEPENHAGEN; NELSON, 1993). Estas cateninas, por sua vez, interagem com a α -catenina, que interage diretamente (HUBER; KROHN; KEMLER, 1997) ou indiretamente com o citoesqueleto de actina (RIMM et al., 1995). No presente estudo, o aumento na expressão da *Cathenin alpha-1* nos animais A/J tratados com F quando comparados com seus respectivos controles, no estágio de secreção, está de acordo com relatos de que o F leva a um aumento de actina filamentosa (F-actina) em ameloblastos (LI et al., 2005).

Estudos têm verificado que a mudança observada tanto na estrutura como na função dos ameloblastos é possível graças a alterações na estrutura do citoesqueleto (BIZ et al., 2010; LI et al., 2011; XUE et al., 2013; ZHANG et al., 2011). F-actina foi localizada nos complexos juncionais dos ameloblastos e também no processo de Tomes (CHALFIE, 1995; NISHIKAWA; FUJIWARA; KITAMURA, 1988; NISHIKAWA; JOSEPHSEN, 1987). Diferentes tipos de células apresentam a ativação da via de sinalização da RhoA, associada a um aumento dos F-actina (RIDLEY; HALL, 1992). A **RhoA** é uma das mais importantes proteínas, dentre as numerosas (mais de 20 identificadas) formas de **Rho GTPases**, desempenhando um papel importante na formação e estruturação do citoesqueleto, bem como em outras atividades celulares (BIZ et al., 2010; LI et al., 2011; RIDLEY; HALL, 1992; VAN AELST; SYMONS, 2002; XUE et al., 2013; ZHANG et al., 2011). Essa proteína tem sido

localizada em ameloblastos secretores, sendo que o tratamento com F provoca alterações no citoesqueleto intracelular de actina, mediadas pela via **ROCK** (Rho/Rho-associated protein kinase) (LI et al., 2005). A RhoA e a ROCK são importantes para a expressão da amelogenina e na diferenciação dos ameloblastos (BIZ et al., 2010). Em adição, tem sido demonstrado que o NaF aumenta a F-actina, através da ativação da via de sinalização da RhoA em fibroblastos, bem como em ameloblastos em culturas de células de dentes de ratos (LI et al., 2005). Quando a atividade da RhoA é bloqueada, na presença de inibidores (Rho kinase), tais como Y-27632, a elevação dos F-actina em dentes tratados com NaF é reduzida, o que indica um papel de RhoA na regulação do citoesqueleto em ameloblastos (LI et al., 2005). Dessa forma, foi identificada, no presente estudo, a *Transforming protein RhoA*, exclusivamente no estágio de secreção, nos animais A/J e 129P3/J tratados com F (mas não nos controles, tabelas 15 e 21, respectivamente), o que está de acordo com a literatura.

Os incisivos de roedores são caracterizados pela sua pigmentação amarelada devido à presença de ferro, que é essencial para o organismo, participando em vários processos celulares, como síntese de DNA, transporte de oxigênio e respiração celular. Quando o ferro não é usado para estes processos, é estocado através da proteína **ferritina (FTH)**, para evitar a formação de espécies reativas de oxigênio, que podem afetar a função celular (ANDERSON; VULPE, 2009; GKOUVATSOS; PAPANIKOLAOU; PANTOPOULOS, 2012). Tem sido relatada elevada expressão do gene *Fth* (que codifica a FTH) em ameloblastos do estágio de maturação, quando comparados aos ameloblastos secretores (LACRUZ et al., 2011), o que foi confirmado por estudos de microscopia eletrônica, que revelaram a presença de FTH apenas em ameloblastos do estágio de maturação e na camada papilar, não sendo expressa em ameloblastos secretores (KALLENBACH, 1970; REITH, 1961; WEN; PAINE, 2013). No presente estudo, entretanto, a *Ferritin light chain* foi identificada, no estágio de maturação, exclusivamente nos animais da linhagem A/J tratados com F, quando comparados aos animais 129P3/J tratados (tabela 11) e quando comparados aos animais da mesma linhagem A/J não tratados (tabela 18). A coloração esbranquiçada dos incisivos de roedores, nos casos de fluorose dentária, é devida à perda do pigmento de ferro no esmalte maduro, sugerindo retenção de ferro no interior dos ameloblastos, o que é condizente com um aumento na expressão de ferritina (LE; DENBESTEN, 2013), como foi observado no presente estudo, onde a *Ferritin light chain* foi detectada exclusivamente nos animais da linhagem A/J tratados com F, no estágio de maturação, mas não nos animais 129P3/J também tratados com F. Outra proteína envolvida com o transporte de ferro é a serotransferrina, que permite que o ferro circule pelo organismo numa forma solúvel, não tóxica, e seja entregue a outros tecidos

(GKOUVATSOS; PAPANIKOLAOU; PANTOPOULOS, 2012). Os ameloblastos possuem receptores para transferrina (LE; DENBESTEN, 2013), permitindo a sua entrada na célula. No presente estudo, a *Serotransferrin* foi detectada exclusivamente, no estágio de secreção, nos animais da linhagem A/J tratados com F, mas não nos animais 129P3/J tratados (tabela 6) e nem nos animais A/J controle (tabela 15). Estes resultados sugerem uma maior disponibilidade de ferro para os animais tratados com F desta linhagem na fase de secreção, o que está de acordo com uma maior expressão de FTH, observada na fase de maturação, como relatado acima. Portanto, alterações na importação e estocagem de ferro também podem estar relacionadas com a susceptibilidade/resistência à fluorose dentária.

Um achado bastante interessante do presente estudo foi a expressão diferencial de uma isoforma do colágeno tipo I, a *Colla1 protein*, que foi identificada com exclusividade, no estágio de maturação, nos animais A/J tratados com F, mas não nos animais 129P3/J tratados com F (tabela 11) e nem nos animais A/J controle (tabela 18), perfil similar ao relatado para a AMEL e Tenascin-W (tabela 11), outra proteína estrutural da matriz do esmalte. Este achado reforça um dos principais eventos observados na fluorose dentária, que é a retenção de proteínas na matriz do esmalte no estágio de maturação, levando ao tão conhecido fenótipo de hipomineralização de subsuperfície, com aparência clínica de esmalte esbranquiçado. Como mencionado anteriormente, esta retenção de proteínas na matriz do esmalte parece ser devida a uma menor degradação das mesmas por proteases da matriz, e não a um aumento de sua secreção (DENBESTEN, 1986). Esta degradação diminuída poderia ser devida a alterações na estrutura das proteínas, em sítios de clivagem críticos para a ação das proteases, ou a alterações no sítio ativo destas proteases, impedindo ou reduzindo a degradação, podendo estes processos serem modulados pelo F. Há dados epidemiológicos que reforçam a primeira hipótese. Foi relatada uma associação entre polimorfismos no gene da COL1A2 e fluorose dentária em populações expostas a altos níveis de F através da água (> 2 mg/L). Indivíduos residentes nas áreas com alta concentração de F na água e que carregavam o genótipo homozigoto PP do polimorfismo *PvuII* da COL1A2 tiveram um risco 5 vezes maior de desenvolver fluorose quando comparados àqueles que carregavam o genótipo homozigoto pp, na área de fluorose endêmica. Entretanto, o risco não foi elevado quando a população controle foi recrutada de uma área não endêmica de fluorose (HUANG, H. et al., 2008), sugerindo a possibilidade de interação gene-ambiente. Em relação à segunda hipótese (alteração no sítio ativo das proteases), vale ressaltar que uma das principais proteases da matriz do esmalte, a MMP20, está localizada no cromossomo 11 (NANCI, 2008) e o estudo de Everett et al. (2009), que avaliou QTLs relacionados à susceptibilidade/resistência à fluorose dentária

utilizando a geração F2 de camundongos A/J e 129P3/J, detectou QTL nos cromossomos 2 e 11, sendo, portanto, o gene da MMP20 um importante alvo a ser estudado. Em adição, foi relatado recentemente que o F, embora em concentrações maiores que aquelas provavelmente presentes no fluido do esmalte dos camundongos do presente estudo, é capaz de inibir as MMP2 e MMP9 (KATO et al., 2013), que são reconhecidas colagenases. Considerando a homologia presente na família das MMPs, deve-se considerar a hipótese de o F inibir também a MMP20, o que merece ser testado. Em virtude do exposto, seria muito interessante conduzir um estudo para avaliar a existência de polimorfismos nos genes das proteínas e proteases da matriz do esmalte destes camundongos, a fim de se detectar alterações nestas proteínas e proteases que poderiam estar interferindo na degradação da matriz do esmalte.

Não se pode deixar de mencionar que foram detectadas, com expressão diferencial, muitas proteínas ainda não caracterizadas. O estudo compreensivo das mesmas, visando à sua caracterização, poderá permitir um grande avanço do conhecimento em relação ao processo da amelogênese em si, e como ele é afetado pelo F, abrindo extensas avenidas de investigação.

Em síntese, nossos resultados mostraram redução na abundância de proteínas do estágio de maturação, quando comparado com o estágio de secreção. O tratamento com F, por sua vez, aumentou consideravelmente o número de *spots* proteicos detectados em ambos os estágios, sendo que este aumento foi maior para os animais da linhagem A/J, indicando uma tentativa de se combater os efeitos deletérios do F e reforçando a maior susceptibilidade aos seus efeitos desta linhagem. A identificação das proteínas com expressão diferencial revelou que tanto a linhagem quanto o tratamento com F levaram à expressão diferencial de proteínas, pertencentes a todas as categorias funcionais. O presente estudo é pioneiro em investigar a expressão proteica diferencial na matriz do esmalte de camundongos expostos ou não ao F e, mais que isto, comparando tanto os estágios de secreção quanto de maturação em animais susceptíveis ou resistentes à fluorose dentária, trazendo informações que auxiliam no entendimento dos mecanismos envolvidos na ocorrência da fluorose dentária e como os mesmos são influenciados pela genética. Estudos adicionais, empregando as informações aqui obtidas, são necessários para validar os resultados obtidos, bem como esclarecer totalmente o(s) mecanismo(s) envolvido(s) na ocorrência da fluorose dentária e a influência do *background* genético neste processo.

Conclusão

6 CONCLUSÕES

Após a administração de água contendo 50 mg/L F ou não (controle), por 6 semanas a camundongos susceptíveis (A/J) e resistentes (129P3/J) à fluorose dentária, verificou-se:

a) aumento da concentração deste íon no plasma e incorporado no esmalte dentário dos animais, sendo este aumento mais pronunciado para a linhagem 129P3/J submetida a 50 mg/L de F;

b) redução na abundância de proteínas do estágio de maturação, quando comparado com o estágio de secreção do esmalte. O tratamento com F, por sua vez, aumentou consideravelmente o número de *spots* proteicos detectados em ambos os estágios, sendo que este aumento foi maior para os animais da linhagem A/J, indicando uma tentativa de se combater os efeitos deletérios do F e reforçando a maior susceptibilidade aos seus efeitos desta linhagem;

c) a identificação das proteínas com expressão diferencial revelou que tanto a linhagem quanto o tratamento com F levaram à expressão diferencial de proteínas, pertencentes a todas as categorias funcionais. O aumento no número de proteínas alteradas na matriz do esmalte do estágio de maturação dos camundongos da linhagem A/J, quando comparado ao camundongos 129P3/J, sugere que aquele animal apresenta um retardo do processo de degradação e remoção das proteínas na presença de F, evento este que pode ajudar a explicar sua susceptibilidade à fluorose dentária.

Sendo assim, os resultados contribuíram para um melhor entendimento acerca dos mecanismos moleculares envolvidos na susceptibilidade genética aos efeitos do F na matriz do esmalte nas linhagens de camundongos avaliadas.

Referências Bibliográficas

REFERÊNCIAS

- Abiko Y, Murata M, Ito Y, Taira T, Nishimura M, Arisue M, et al. Immunohistochemical localization of amelogenin in human odontogenic tumors, using a polyclonal antibody against bovine amelogenin. *Med Electron Microsc.* 2001;34(3):185-9.
- Abuladze N, Lee I, Newman D, Hwang J, Boorer K, Pushkin A, et al. Molecular cloning, chromosomal localization, tissue distribution, and functional expression of the human pancreatic sodium bicarbonate cotransporter. *J Biol Chem.* 1998;273(28):17689-95.
- Aebersold R, Mann M. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature.* 2003;422(6928):198-207.
- Aisen P, Leibman A, Zweier J. Stoichiometric and site characteristics of the binding of iron to human transferrin. *J Biol Chem.* 1978;253(6):1930-7.
- Al Kawas S, Amizuka N, Bergeron JJ, Warshawsky H. Immunolocalization of the cation-independent mannose 6-phosphate receptor and cathepsin B in the enamel organ and alveolar bone of the rat incisor. *Calcif Tissue Int.* 1996;59(3):192-9.
- Alliot-Licht B, Bluteau G, Magne D, Lopez-Cazaux S, Lieubeau B, Daculsi G, et al. Dexamethasone stimulates differentiation of odontoblast-like cells in human dental pulp cultures. *Cell Tissue Res.* 2005;321(3):391-400.
- Anderson GJ, Vulpe CD. Mammalian iron transport. *Cell Mol Life Sci.* 2009;66(20):3241-61.
- Angmar-Mansson B, Lindh U, Whitford GM. Enamel and dentin fluoride levels and fluorosis following single fluoride doses: a nuclear microprobe study. *Caries Res.* 1990;24(4):258-62.
- Angmar-Mansson B, Whitford GM. Enamel fluorosis related to plasma F levels in the rat. *Caries Res.* 1984;18(1):25-32.
- Angmar-Mansson B, Whitford GM. Plasma fluoride levels and enamel fluorosis in the rat. *Caries Res.* 1982;16(4):334-9.
- Aoba T, Fejerskov O. Dental fluorosis: chemistry and biology. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2002;13(2):155-70.

Aoba T, Fukae M, Tanabe T, Shimizu M, Moreno EC. Selective adsorption of porcine-amelogenins onto hydroxyapatite and their inhibitory activity on hydroxyapatite growth in supersaturated solutions. *Calcif Tissue Int.* 1987;41(5):281-9.

Aoba T, Komatsu H, Shimazu Y, Yagishita H, Taya Y. Enamel mineralization and an initial crystalline phase. *Connect Tissue Res.* 1998;38(1-4):129-37;discussion 39-45.

Aoba T, Moreno EC, Tanabe T, Fukae M. Effects of fluoride on matrix proteins and their properties in rat secretory enamel. *J Dent Res.* 1990;69(6):1248-55.

Aoba T, Moreno EC. The enamel fluid in the early secretory stage of porcine amelogenesis: chemical composition and saturation with respect to enamel mineral. *Calcif Tissue Int.* 1987;41(2):86-94.

Aoba T, Shimoda S, Shimokawa H, Inage T. Common epitopes of mammalian amelogenins at the C-terminus and possible functional roles of the corresponding domain in enamel mineralization. *Calcif Tissue Int.* 1992;51(1):85-91.

Aoba T. The effect of fluoride on apatite structure and growth. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1997;8(2):136-53.

Arquitt CK, Boyd C, Wright JT. Cystic fibrosis transmembrane regulator gene (CFTR) is associated with abnormal enamel formation. *J Dent Res.* 2002;81(7):492-6.

Athanassiou-Papaefthymiou M, Kim D, Harbron L, Papagerakis S, Schnell S, Harada H, et al. Molecular and circadian controls of ameloblasts. *Eur J Oral Sci.* 2011;119 Suppl 1:35-40.

Atkinson AJ, Colburn WA, Degruittola VG, Demets DL, Downing GJ, Hoth DF, et al. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther.* 2001;69(3):89-95.

Awad M, Al-Ashwal AA, Sakati N, Al-Abbad AA, Bin-Abbas BS. Long-term follow up of carbonic anhydrase II deficiency syndrome. *Saudi Med J.* 2002;23(1):25-9.

Bansal AK, Shetty DC, Bindal R, Pathak A. Amelogenin: A novel protein with diverse applications in genetic and molecular profiling. *J Oral Maxillofac Pathol.* 2012;16(3):395-9.

Bantscheff M, Schirle M, Sweetman G, Rick J, Kuster B. Quantitative mass spectrometry in proteomics: a critical review. *Anal Bioanal Chem.* 2007;389(4):1017-31.

Barbier O, Arreola-Mendoza L, Del Razo LM. Molecular mechanisms of fluoride toxicity. *Chem Biol Interact.* 2010;188(2):319-33.

Bartlett JD, Dobeck JM, Tye CE, Perez-Moreno M, Stokes N, Reynolds AB, et al. Targeted p120-catenin ablation disrupts dental enamel development. *PLoS One.* 2010;5(9).

Bartlett JD, Dwyer SE, Beniash E, Skobe Z, Payne-Ferreira TL. Fluorosis: a new model and new insights. *J Dent Res.* 2005;84(9):832-6.

Bartlett JD, Ganss B, Goldberg M, Moradian-Oldak J, Paine ML, Snead ML, et al. 3. Protein-protein interactions of the developing enamel matrix. *Curr Top Dev Biol.* 2006a;74:57-115.

Bartlett JD, Simmer JP. Proteinases in developing dental enamel. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1999;10(4):425-41.

Bartlett JD, Skobe Z, Lee DH, Wright JT, Li Y, Kulkarni AB, et al. A developmental comparison of matrix metalloproteinase-20 and amelogenin null mouse enamel. *Eur J Oral Sci.* 2006b;114 Suppl 1:18-23; discussion 39-41, 379.

Bartlett JD, Skobe Z, Nanci A, Smith CE. Matrix metalloproteinase 20 promotes a smooth enamel surface, a strong dentino-enamel junction, and a decussating enamel rod pattern. *Eur J Oral Sci.* 2011;119 Suppl 1:199-205.

Bartlett JD, Smith CE. Modulation of cell-cell junctional complexes by matrix metalloproteinases. *J Dent Res.* 2013;92(1):10-7.

Bawden JW, Crenshaw MA, Wright JT, LeGeros RZ. Consideration of possible biologic mechanisms of fluorosis. *J Dent Res.* 1995;74(7):1349-52.

Bawden JW, Wennberg A, Hammarstrom L. In vivo and in vitro study of ⁵⁹Fe uptake in developing rat molars. *Acta Odontol Scand.* 1978;36(5):271-7.

Bawden JW. Calcium transport during mineralization. *Anat Rec.* 1989;224(2):226-33.

Berger J, Hauber J, Hauber R, Geiger R, Cullen BR. Secreted placental alkaline phosphatase: a powerful new quantitative indicator of gene expression in eukaryotic cells. *Gene.* 1988;66(1):1-10.

Bertolotti A, Zhang Y, Hendershot LM, Harding HP, Ron D. Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat Cell Biol.* 2000;2(6):326-32.

Bevensee MO, Schmitt BM, Choi I, Romero MF, Boron WF. An electrogenic Na(+)-HCO⁻(3) cotransporter (NBC) with a novel COOH-terminus, cloned from rat brain. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2000;278(6):C1200-11.

Bezerra de Menezes LM, Volpato MC, Rosalen PL, Cury JA. Bone as a biomarker of acute fluoride toxicity. *Forensic Sci Int*. 2003;137(2-3):209-14.

Bhussry BR. Chemical and physical studies of enamel from human teeth. IV. Density and nitrogen content of mottled enamel. *J Dent Res*. 1959;38(2):369-73.

Biz MT, Marques MR, Crema VO, Moriscot AS, dos Santos MF. GTPases RhoA and Rac1 are important for amelogenin and DSPP expression during differentiation of ameloblasts and odontoblasts. *Cell Tissue Res*. 2010;340(3):459-70.

Bogue MA, Grubb SC, Maddatu TP, Bult CJ. Mouse Phenome Database (MPD). *Nucleic Acids Res*. 2007;35(Database issue):D643-9.

Bouropoulos N, Moradian-Oldak J. Induction of apatite by the cooperative effect of amelogenin and the 32-kDa enamelin. *J Dent Res*. 2004;83(4):278-82.

Bronckers A, Kalogeraki L, Jorna HJ, Wilke M, Bervoets TJ, Lyaruu DM, et al. The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) is expressed in maturation stage ameloblasts, odontoblasts and bone cells. *Bone*. 2010;46(4):1188-96.

Bronckers AL, Jansen LL, Woltgens JH. A histological study of the short-term effects of fluoride on enamel and dentine formation in hamster tooth-germs in organ culture in vitro. *Arch Oral Biol*. 1984b;29(10):803-10.

Bronckers AL, Jansen LL, Woltgens JH. Long-term (8 days) effects of exposure to low concentrations of fluoride on enamel formation in hamster tooth-germs in organ culture in vitro. *Arch Oral Biol*. 1984a;29(10):811-9.

Bronckers AL, Lyaruu DM, Bervoets TJ, Woltgens JH. Fluoride enhances intracellular degradation of amelogenins during secretory phase of amelogenesis of hamster teeth in organ culture. *Connect Tissue Res*. 2002;43(2-3):456-65.

Bronckers AL, Lyaruu DM, DenBesten PK. The impact of fluoride on ameloblasts and the mechanisms of enamel fluorosis. *J Dent Res*. 2009;88(10):877-93.

Bronckers AL, Woltgens JH. Short-term effects of fluoride on biosynthesis of enamel-matrix proteins and dentine collagens and on mineralization during hamster tooth-germ development in organ culture. *Arch Oral Biol*. 1985;30(2):181-91.

Brookes SJ, Kingswell NJ, Barron MJ, Dixon MJ, Kirkham J. Is the 32-kDa fragment the functional enamel unit in all species? *Eur J Oral Sci.* 2011;119 Suppl 1:345-50.

Browne D, Whelton H, O'Mullane D. Fluoride metabolism and fluorosis. *J Dent.* 2005;33(3):177-86.

Butler WJ, Segreto V, Collins E. Prevalence of dental mottling in school-aged lifetime residents of 16 Texas communities. *Am J Public Health.* 1985;75(12):1408-12.

Buzalaf MA, Levy SM. Fluoride intake of children: considerations for dental caries and dental fluorosis. *Monogr Oral Sci.* 2011;22:1-19.

Buzalaf MA, Pessan JP, Honorio HM, ten Cate JM. Mechanisms of action of fluoride for caries control. *Monogr Oral Sci.* 2011;22:97-114.

Buzalaf MA, Whitford GM. Fluoride metabolism. *Monogr Oral Sci.* 2011;22:20-36.

Cam Y, Boukari A, Ruch JV. Stimulatory effect of transferrin on the proliferation of embryonic mouse molar pre-odontoblasts and pre-ameloblasts in organ culture. *Arch Oral Biol.* 1989;34(3):153-9.

Candiano G, Bruschi M, Musante L, Santucci L, Ghiggeri GM, Carnemolla B, et al. Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis.* 2004;25(9):1327-33.

Cantu MD. Análise proteômica diferencial aplicada para o estudo da morte súbita dos citros São Carlos: Universidade de São Paulo; 2007.

Carvalho JG, Leite Ade L, Peres-Buzalaf C, Salvato F, Labate CA, Everett ET, et al. Renal proteome in mice with different susceptibilities to fluorosis. *PLoS One.* 2013;8(1):e53261.

Carvalho JG, Leite AL, Yan D, Everett ET, Whitford GM, Buzalaf MA. Influence of genetic background on fluoride metabolism in mice. *J Dent Res.* 2009;88(11):1054-8.

Caterina JJ, Skobe Z, Shi J, Ding Y, Simmer JP, Birkedal-Hansen H, et al. Enamelysin (matrix metalloproteinase 20)-deficient mice display an amelogenesis imperfecta phenotype. *J Biol Chem.* 2002;277(51):49598-604.

Chalfie M. Green fluorescent protein. *Photochem Photobiol.* 1995;62(4):651-6.

Chen TL. Inhibition of growth and differentiation of osteoprogenitors in mouse bone marrow stromal cell cultures by increased donor age and glucocorticoid treatment. *Bone*. 2004;35(1):83-95.

Cheng TJ, Chen TM, Chen CH, Lai YK. Induction of stress response and differential expression of 70 kDa stress proteins by sodium fluoride in HeLa and rat brain tumor 9L cells. *J Cell Biochem*. 1998;69(2):221-31.

Chou MY, Yan D, Jafarov T, Everett ET. Modulation of murine bone marrow-derived CFU-F and CFU-OB by in vivo bisphosphonate and fluoride treatments. *Orthod Craniofac Res*. 2009;12(2):141-7.

Chun YH, Yamakoshi Y, Yamakoshi F, Fukae M, Hu JC, Bartlett JD, et al. Cleavage site specificity of MMP-20 for secretory-stage ameloblastin. *J Dent Res*. 2010;89(8):785-90.

Collins FS. Cystic fibrosis: molecular biology and therapeutic implications. *Science*. 1992;256(5058):774-9.

Collinson IR, Fearnley IM, Skehel JM, Runswick MJ, Walker JE. ATP synthase from bovine heart mitochondria: identification by proteolysis of sites in F₀ exposed by removal of F₁ and the oligomycin-sensitivity conferral protein. *Biochem J*. 1994;303 (Pt 2):639-45.

Colucci-D'Amato L, Farina A, Vissers JP, Chambery A. Quantitative neuroproteomics: classical and novel tools for studying neural differentiation and function. *Stem Cell Rev*. 2011;7(1):77-93.

Constantinou CD, Spotila LD, Zhuang J, Sereda L, Hanning C, Prockop DJ. PvuII polymorphism at the COL1A2 locus. *Nucleic Acids Res*. 1990;18(18):5577.

Dass C. *Fundamentals of contemporary mass spectrometry*. Hoboken: Wiley-interscience; 2007.

Den Besten PK. Effects of fluoride on protein secretion and removal during enamel development in the rat. *J Dent Res*. 1986;65(10):1272-7.

Denbesten P, Li W. Chronic fluoride toxicity: dental fluorosis. *Monogr Oral Sci*. 2011;22:81-96.

Denbesten PK, Crenshaw MA, Wilson MH. Changes in the fluoride-induced modulation of maturation stage ameloblasts of rats. *J Dent Res*. 1985;64(12):1365-70.

DenBesten PK, Crenshaw MA. Studies on the changes in developing enamel caused by ingestion of high levels of fluoride in the rat. *Adv Dent Res.* 1987;1(2):176-80.

DenBesten PK, Crenshaw MA. The effects of chronic high fluoride levels on forming enamel in the rat. *Arch Oral Biol.* 1984;29(9):675-9.

DenBesten PK, Heffernan LM, Featherstone JD, Shields CP. Fluoride binding by matrix proteins in rat mineralizing tissue. *Arch Oral Biol.* 1992;37(6):459-62.

DenBesten PK, Heffernan LM, Treadwell BV, Awbrey BJ. The presence and possible functions of the matrix metalloproteinase collagenase activator protein in developing enamel matrix. *Biochem J.* 1989;264(3):917-20.

DenBesten PK, Heffernan LM. Enamel proteases in secretory and maturation enamel of rats ingesting 0 and 100 PPM fluoride in drinking water. *Adv Dent Res.* 1989;3(2):199-202.

DenBesten PK, Thariani H. Biological mechanisms of fluorosis and level and timing of systemic exposure to fluoride with respect to fluorosis. *J Dent Res.* 1992;71(5):1238-43.

DenBesten PK, Yan Y, Featherstone JD, Hilton JF, Smith CE, Li W. Effects of fluoride on rat dental enamel matrix proteinases. *Arch Oral Biol.* 2002;47(11):763-70.

DenBesten PK, Zhu L, Li W, Tanimoto K, Liu H, Witkowska HE. Fluoride incorporation into apatite crystals delays amelogenin hydrolysis. *Eur J Oral Sci.* 2011;119 Suppl 1:3-7.

Diekwisch TG, Ware J, Fincham AG, Zeichner-David M. Immunohistochemical similarities and differences between amelogenin and tuftelin gene products during tooth development. *J Histochem Cytochem.* 1997;45(6):859-66.

Dinour D, Chang MH, Satoh J, Smith BL, Angle N, Knecht A, et al. A novel missense mutation in the sodium bicarbonate cotransporter (NBCe1/SLC4A4) causes proximal tubular acidosis and glaucoma through ion transport defects. *J Biol Chem.* 2004;279(50):52238-46.

Dogterom AA, Bronckers AL. Carbonic anhydrase in developing hamster molars. *J Dent Res.* 1983;62(7):789-91.

Drumm ML, Collins FS. Molecular biology of cystic fibrosis. *Mol Genet Med.* 1993;3:33-68.

Dunipace AJ, Brizendine EJ, Zhang W, Wilson ME, Miller LL, Katz BP, et al. Effect of aging on animal response to chronic fluoride exposure. *J Dent Res.* 1995;74(1):358-68.

Everett ET, McHenry MA, Reynolds N, Eggertsson H, Sullivan J, Kantmann C, et al. Dental fluorosis: variability among different inbred mouse strains. *J Dent Res.* 2002;81(11):794-8.

Everett ET, Yan D, Weaver M, Liu L, Foroud T, Martinez-Mier EA. Detection of dental fluorosis-associated quantitative trait Loci on mouse chromosomes 2 and 11. *Cells Tissues Organs.* 2009;189(1-4):212-8.

Everett ET, Yin Z, Yan D, Zou F. Fine mapping of dental fluorosis quantitative trait loci in mice. *Eur J Oral Sci.* 2011;119 Suppl 1:8-12.

Everett ET. Fluoride's effects on the formation of teeth and bones, and the influence of genetics. *J Dent Res.* 2011;90(5):552-60.

Fan Y, Nelson JR, Alvarez JR, Hagan J, Berrier A, Xu X. Amelogenin-assisted ex vivo remineralization of human enamel: Effects of supersaturation degree and fluoride concentration. *Acta Biomater.* 2011;7(5):2293-302.

Fausser JL, Schlepp O, Aberdam D, Meneguzzi G, Ruch JV, Lesot H. Localization of antigens associated with adherens junctions, desmosomes, and hemidesmosomes during murine molar morphogenesis. *Differentiation.* 1998;63(1):1-11.

Fearne JM, Bryan EM, Elliman AM, Brook AH, Williams DM. Enamel defects in the primary dentition of children born weighing less than 2000 g. *Br Dent J.* 1990;168(11):433-7.

Fejerskov O, Johnson NW, Silverstone LM. The ultrastructure of fluorosed human dental enamel. *Scand J Dent Res.* 1974;82(5):357-72.

Fejerskov O, Larsen MJ, Josephsen K, Thylstrup A. Effect of long-term administration of fluoride on plasma fluoride and calcium in relation to forming enamel and dentin in rats. *Scand J Dent Res.* 1979;87(2):98-104.

Fejerskov O, Larsen MJ, Richards A, Baelum V. Dental tissue effects of fluoride. *Adv Dent Res.* 1994;8(1):15-31.

Fejerskov O, Richards A, DenBesten P. The effect of fluoride on tooth mineralization. In: Fejerskov O, Ekstrand J, Burt BA, editors. *Fluoride in dentistry.* Copenhagen: Munksgaard; 1996. p. 112-46.

Fejerskov O, Thylstrup A, Larsen MJ. Clinical and structural features and possible pathogenic mechanisms of dental fluorosis. *Scand J Dent Res.* 1977;85(7):510-34.

- Fincham AG, Hu Y, Lau EC, Slavkin HC, Snead ML. Amelogenin post-secretory processing during biomineralization in the postnatal mouse molar tooth. *Arch Oral Biol.* 1991;36(4):305-17.
- Fincham AG, Moradian-Oldak J, Diekwisch TG, Lyaruu DM, Wright JT, Bringas P, Jr., et al. Evidence for amelogenin "nanospheres" as functional components of secretory-stage enamel matrix. *J Struct Biol.* 1995;115(1):50-9.
- Fincham AG, Moradian-Oldak J, Simmer JP. The structural biology of the developing dental enamel matrix. *J Struct Biol.* 1999;126(3):270-99.
- Fincham AG, Moradian-Oldak J. Recent advances in amelogenin biochemistry. *Connect Tissue Res.* 1995;32(1-4):119-24.
- Forrest A, Gabrielli B. Cdc25B activity is regulated by 14-3-3. *Oncogene.* 2001;20(32):4393-401.
- Gallon V, Chen L, Yang X, Moradian-Oldak J. Localization and quantitative co-localization of enamelin with amelogenin. *J Struct Biol.* 2013.
- Gawenis LR, Bradford EM, Prasad V, Lorenz JN, Simpson JE, Clarke LL, et al. Colonic anion secretory defects and metabolic acidosis in mice lacking the NBC1 Na⁺/HCO₃⁻ cotransporter. *J Biol Chem.* 2007;282(12):9042-52.
- Gawenis LR, Ledoussal C, Judd LM, Prasad V, Alper SL, Stuart-Tilley A, et al. Mice with a targeted disruption of the AE2 Cl⁻/HCO₃⁻ exchanger are achlorhydric. *J Biol Chem.* 2004;279(29):30531-9.
- Ge Y, Niu R, Zhang J, Wang J. Proteomic analysis of brain proteins of rats exposed to high fluoride and low iodine. *Arch Toxicol.* 2011;85(1):27-33.
- GE-Healthcare. 2-D Electrophoresis: Principles and methods. Buckinghamshire GE Healthcare; 2004.
- Gerlach RF, de Souza AP, Cury JA, Line SR. Fluoride effect on the activity of enamel matrix proteinases in vitro. *Eur J Oral Sci.* 2000;108(1):48-53.
- Gerlach, RF; Line SRP. Ameloblastos. *Inn Células uma abordagem multidisciplinar.* Editora Manole Ltda; Barueri – Manole; 2005.

Gibson CW, Yuan ZA, Hall B, Longenecker G, Chen E, Thyagarajan T, et al. Amelogenin-deficient mice display an amelogenesis imperfecta phenotype. *J Biol Chem*. 2001;276(34):31871-5.

Gillette MA, Mani DR, Carr SA. Place of pattern in proteomic biomarker discovery. *J Proteome Res*. 2005;4(4):1143-54.

Gkouvatsos K, Papanikolaou G, Pantopoulos K. Regulation of iron transport and the role of transferrin. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1820(3):188-202.

Gorg A, Weiss W, Dunn MJ. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics*. 2004;4(12):3665-85.

Grubb SC, Maddatu TP, Bult CJ, Bogue MA. Mouse phenome database. *Nucleic Acids Res*. 2009;37(Database issue):D720-30.

Halse A. Effect of dietary iron deficiency on the pigmentation and iron content of rat incisor enamel. *Scand J Dent Res*. 1973;81(4):319-34.

Hancock WS. What is new in proteomics? Biomarkers. *J Proteome Res*. 2003;2(5):457.

Hardwick JM, Chen YB, Jonas EA. Multipolar functions of BCL-2 proteins link energetics to apoptosis. *Trends Cell Biol*. 2012;22(6):318-28.

Harrison PM. Ferritin: an iron-storage molecule. *Semin Hematol*. 1977;14(1):55-70.

Hart PS, Hart TC, Michalec MD, Ryu OH, Simmons D, Hong S, et al. Mutation in kallikrein 4 causes autosomal recessive hypomaturation amelogenesis imperfecta. *J Med Genet*. 2004;41(7):545-9.

Hengstschlager M, Rosner M, Fountoulakis M, Lubec G. Tuberous sclerosis genes regulate cellular 14-3-3 protein levels. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;312(3):676-83.

Hewett-Emmett D, Tashian RE. Functional diversity, conservation, and convergence in the evolution of the alpha-, beta-, and gamma-carbonic anhydrase gene families. *Mol Phylogenet Evol*. 1996;5(1):50-77.

Heymann R, About I, Lendahl U, Franquin JC, Obrink B, Mitsiadis TA. E- and N-cadherin distribution in developing and functional human teeth under normal and pathological conditions. *Am J Pathol*. 2002;160(6):2123-33.

Hiramatsu N, Kasai A, Hayakawa K, Yao J, Kitamura M. Real-time detection and continuous monitoring of ER stress in vitro and in vivo by ES-TRAP: evidence for systemic, transient ER stress during endotoxemia. *Nucleic Acids Res.* 2006;34(13):e93.

Hofmann B, Hecht HJ, Flohe L. Peroxiredoxins. *Biol Chem.* 2002;383(3-4):347-64.

Hu CC, Fukae M, Uchida T, Qian Q, Zhang CH, Ryu OH, et al. Cloning and characterization of porcine enamel mRNAs. *J Dent Res.* 1997;76(11):1720-9.

Hu JC, Chun YH, Al Hazzazzi T, Simmer JP. Enamel formation and amelogenesis imperfecta. *Cells Tissues Organs.* 2007;186(1):78-85.

Hu JC, Hu Y, Smith CE, McKee MD, Wright JT, Yamakoshi Y, et al. Enamel defects and ameloblast-specific expression in Enam knock-out/lacZ knock-in mice. *J Biol Chem.* 2008;283(16):10858-71.

Hu JC, Lertlam R, Richardson AS, Smith CE, McKee MD, Simmer JP. Cell proliferation and apoptosis in enamel null mice. *Eur J Oral Sci.* 2011;119 Suppl 1:329-37.

Hu JC, Ryu OH, Chen JJ, Uchida T, Wakida K, Murakami C, et al. Localization of EMSP1 expression during tooth formation and cloning of mouse cDNA. *J Dent Res.* 2000;79(1):70-6.

Hu JC, Sun X, Zhang C, Liu S, Bartlett JD, Simmer JP. Enamelysin and kallikrein-4 mRNA expression in developing mouse molars. *Eur J Oral Sci.* 2002;110(4):307-15.

Hu P, Lacruz RS, Smith CE, Smith SM, Kurtz I, Paine ML. Expression of the sodium/calcium/potassium exchanger, NCKX4, in ameloblasts. *Cells Tissues Organs.* 2012;196(6):501-9.

Hu Y, Hu JC, Smith CE, Bartlett JD, Simmer JP. Kallikrein-related peptidase 4, matrix metalloproteinase 20, and the maturation of murine and porcine enamel. *Eur J Oral Sci.* 2011;119 Suppl 1:217-25.

Huang H, Ba Y, Cui L, Cheng X, Zhu J, Zhang Y, et al. COL1A2 gene polymorphisms (Pvu II and Rsa I), serum calciotropic hormone levels, and dental fluorosis. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2008;36(6):517-22.

Huang Y, Goldberg M, Le T, Qiang R, Warner D, Witkowska HE, et al. Amelogenin exons 8 and 9 encoded peptide enhances leucine rich amelogenin peptide mediated dental pulp repair. *Cells Tissues Organs.* 2012;196(2):151-60.

Hubbard MJ. Calcium transport across the dental enamel epithelium. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2000;11(4):437-66.

Huber O, Krohn M, Kemler R. A specific domain in alpha-catenin mediates binding to beta-catenin or plakoglobin. *J Cell Sci*. 1997;110 (Pt 15):1759-65.

Iijima M, Fan D, Bromley KM, Sun Z, Moradian-Oldak J. Tooth enamel proteins enamelin and amelogenin cooperate to regulate the growth morphology of octacalcium phosphate crystals. *Cryst Growth Des*. 2010;10(11):4815-22.

Illek B, Fischer H, Machen TE. Genetic disorders of membrane transport. II. Regulation of CFTR by small molecules including HCO₃. *Am J Physiol*. 1998;275(6 Pt 1):G1221-6.

Inage T, Toda Y. Gene expression of TGF-beta 1 and elaboration of extracellular matrix using in situ hybridization and EM radioautography during dentinogenesis. *Anat Rec*. 1996;245(2):250-66.

Inatomi J, Horita S, Braverman N, Sekine T, Yamada H, Suzuki Y, et al. Mutational and functional analysis of SLC4A4 in a patient with proximal renal tubular acidosis. *Pflugers Arch*. 2004;448(4):438-44.

Ishii T, Suckling G. The appearance of tooth enamel in children ingesting water with a high fluoride content for a limited period during early tooth development. *J Dent Res*. 1986;65(7):974-7.

Issaq H, Veenstra T. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE): advances and perspectives. *Biotechniques*. 2008;44(5):697-8, 700.

Iwasaki K, Bajenova E, Somogyi-Ganss E, Miller M, Nguyen V, Nourkeyhani H, et al. Amelotin--a Novel Secreted, Ameloblast-specific Protein. *J Dent Res*. 2005;84(12):1127-32.

Iwata T, Yamakoshi Y, Hu JC, Ishikawa I, Bartlett JD, Krebsbach PH, et al. Processing of ameloblastin by MMP-20. *J Dent Res*. 2007;86(2):153-7.

Janke C, Kneussel M. Tubulin post-translational modifications: encoding functions on the neuronal microtubule cytoskeleton. *Trends Neurosci*. 2010;33(8):362-72.

Jernvall J, Thesleff I. Reiterative signaling and patterning during mammalian tooth morphogenesis. *Mech Dev*. 2000;92(1):19-29.

Josephsen K, Fejerskov O. Ameloblast modulation in the maturation zone of the rat incisor enamel organ. A light and electron microscopic study. *J Anat.* 1977;124(Pt 1):45-70.

Josephsen K, Takano Y, Frische S, Praetorius J, Nielsen S, Aoba T, et al. Ion transporters in secretory and cyclically modulating ameloblasts: a new hypothesis for cellular control of preeruptive enamel maturation. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2010;299(6):C1299-307.

Junqueira, LC; Carneiro, J. *Histologia Básica*. Ed. 10. Rio de Janeiro: Guanabara KOOGAN S. A; 2004.

Takei M, Nakahara H. Aspects of carbonic anhydrase and carbonate content during mineralization of the rat enamel. *Biochim Biophys Acta.* 1996;1289(2):226-30.

Kallenbach E. Fine structure of rat incisor enamel organ during late pigmentation and regression stages. *J Ultrastruct Res.* 1970;30(1):38-63.

Kardos TB, Hunter AR, Hubbard MJ. Scanning electron microscopy of trypsin-treated enamel from fluorosed rat molars. *Adv Dent Res.* 1989;3(2):183-7.

Kato K, Nakagaki H, Sakakibara Y, Weatherell JA, Robinson C. The dissolution rate of enamel in acid in developing rat incisors. *Arch Oral Biol.* 1988;33(9):657-60.

Katchburian, E; Arana, V. *Histologia e embriologia oral*. Ed. 3a. Rio de Janeiro: Guanabara KOOGAN S.A; 2012.

Kerebel B, Daculsi G. [Ultrastructural and crystallographic study of human enamel in endemic fluorosis]. *J Biol Buccale.* 1976;4(2):143-54.

Kerley MA, Kollar EJ. Regeneration of tooth development in vitro following sodium fluoride treatment. *Am J Anat.* 1977;149(2):181-95.

Khan A, Moola MH, Cleaton-Jones P. Global trends in dental fluorosis from 1980 to 2000: a systematic review. *SADJ.* 2005;60(10):418-21.

Khan F, Liu H, Reyes A, Witkowska HE, Martinez-Avila O, Zhu L, et al. The proteolytic processing of amelogenin by enamel matrix metalloproteinase (MMP-20) is controlled by mineral ions. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1830(3):2600-7.

Kierdorf H, Kierdorf U, Richards A, Josephsen K. Fluoride-induced alterations of enamel structure: an experimental study in the miniature pig. *Anat Embryol (Berl).* 2004;207(6):463-74.

Kierdorf H, Kierdorf U. Disturbances of the secretory stage of amelogenesis in fluorosed deer teeth: a scanning electron-microscopic study. *Cell Tissue Res.* 1997;289(1):125-35.

Kim JW, Simmer JP, Hart TC, Hart PS, Ramaswami MD, Bartlett JD, et al. MMP-20 mutation in autosomal recessive pigmented hypomaturation amelogenesis imperfecta. *J Med Genet.* 2005;42(3):271-5.

Kirkham J, Brookes SJ, Zhang J, Wood SR, Shore RC, Smith DA, et al. Effect of experimental fluorosis on the surface topography of developing enamel crystals. *Caries Res.* 2001;35(1):50-6.

Klose J. Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. *Humangenetik.* 1975;26(3):231-43.

Kobayashi CA, Leite AL, Silva TL, Santos LD, Nogueira FC, Oliveira RC, et al. Proteomic analysis of kidney in rats chronically exposed to fluoride. *Chem Biol Interact.* 2009;180(2):305-11.

Kobayashi CA. Efeito do fluoreto no osso de camundongos com diferentes susceptibilidade genética a fluorose: uma análise proteômica. [Tese de Doutorado]. Bauru (SP): Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo; 2012.

Koussoulakou DS, Margaritis LH, Koussoulakos SL. Antagonists of retinoic acid and BMP4 affect fetal mouse osteogenesis and odontoblast differentiation. *Pathophysiology.* 2011;18(2):103-9.

Kubota K, Lee DH, Tsuchiya M, Young CS, Everett ET, Martinez-Mier EA, et al. Fluoride induces endoplasmic reticulum stress in ameloblasts responsible for dental enamel formation. *J Biol Chem.* 2005;280(24):23194-202.

Kurkinen M, Taylor A, Garrels JI, Hogan BL. Cell surface-associated proteins which bind native type IV collagen or gelatin. *J Biol Chem.* 1984;259(9):5915-22.

Kurschat CE, Shmukler BE, Jiang L, Wilhelm S, Kim EH, Chernova MN, et al. Alkaline-shifted pHo sensitivity of AE2c1-mediated anion exchange reveals novel regulatory determinants in the AE2 N-terminal cytoplasmic domain. *J Biol Chem.* 2006;281(4):1885-96.

Lacruz RS, Brookes SJ, Wen X, Jimenez JM, Vikman S, Hu P, et al. Adaptor protein complex 2-mediated, clathrin-dependent endocytosis, and related gene activities, are a prominent feature during maturation stage amelogenesis. *J Bone Miner Res.* 2013;28(3):672-87.

Lacruz RS, Hacia JG, Bromage TG, Boyde A, Lei Y, Xu Y, et al. The circadian clock modulates enamel development. *J Biol Rhythms*. 2012a;27(3):237-45.

Lacruz RS, Hilvo M, Kurtz I, Paine ML. A survey of carbonic anhydrase mRNA expression in enamel cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010a;393(4):883-7.

Lacruz RS, Nakayama Y, Holcroft J, Nguyen V, Somogyi-Ganss E, Snead ML, et al. Targeted overexpression of amelotin disrupts the microstructure of dental enamel. *PLoS One*. 2012b;7(4):e35200.

Lacruz RS, Nanci A, Kurtz I, Wright JT, Paine ML. Regulation of pH During Amelogenesis. *Calcif Tissue Int*. 2010b;86(2):91-103.

Lacruz RS, Nanci A, White SN, Wen X, Wang H, Zalzal SF, et al. The sodium bicarbonate cotransporter (NBCe1) is essential for normal development of mouse dentition. *J Biol Chem*. 2010c;285(32):24432-8.

Lacruz RS, Smith CE, Bringas P, Jr., Chen YB, Smith SM, Snead ML, et al. Identification of novel candidate genes involved in mineralization of dental enamel by genome-wide transcript profiling. *J Cell Physiol*. 2012c;227(5):2264-75.

Lacruz RS, Smith CE, Chen YB, Hubbard MJ, Hacia JG, Paine ML. Gene-expression analysis of early- and late-maturation-stage rat enamel organ. *Eur J Oral Sci*. 2011;119 Suppl 1:149-57.

Lecanda J, Urtasun R, Medina JF. Molecular cloning and genomic organization of the mouse AE2 anion exchanger gene. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;276(1):117-24.

Lee AS. GRP78 induction in cancer: therapeutic and prognostic implications. *Cancer Res*. 2007;67(8):3496-9.

Lee AS. The glucose-regulated proteins: stress induction and clinical applications. *Trends Biochem Sci*. 2001;26(8):504-10.

Lee SK, Seymen F, Kang HY, Lee KE, Gencay K, Tuna B, et al. MMP20 hemopexin domain mutation in amelogenesis imperfecta. *J Dent Res*. 2010;89(1):46-50.

Leinonen J, Kivela J, Parkkila S, Parkkila AK, Rajaniemi H. Salivary carbonic anhydrase isoenzyme VI is located in the human enamel pellicle. *Caries Res*. 1999;33(3):185-90.

- Leite AL. A análise proteômica em rim de ratos submetidos à exposição aguda ao flúor. [dissertação]. Bauru (SP): Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo; 2010.
- Levenson GE. The effect of fluoride on ameloblasts of mouse molar tooth germs "in vitro". *J Biol Buccale*. 1980;8(3):255-63.
- Levi S, Corsi B, Rovida E, Cozzi A, Santambrogio P, Albertini A, et al. Construction of a ferroxidase center in human ferritin L-chain. *J Biol Chem*. 1994a;269(48):30334-9.
- Levi S, Santambrogio P, Cozzi A, Rovida E, Corsi B, Tamborini E, et al. The role of the L-chain in ferritin iron incorporation. Studies of homo and heteropolymers. *J Mol Biol*. 1994b;238(5):649-54.
- Leyva JA, Bianchet MA, Amzel LM. Understanding ATP synthesis: structure and mechanism of the F1-ATPase (Review). *Mol Membr Biol*. 2003;20(1):27-33.
- Li Y, Decker S, Yuan ZA, Denbesten PK, Aragon MA, Jordan-Sciutto K, et al. Effects of sodium fluoride on the actin cytoskeleton of murine ameloblasts. *Arch Oral Biol*. 2005;50(8):681-8.
- Li Y, Pugach MK, Kuehl MA, Peng L, Bouchard J, Hwang SY, et al. Dental enamel structure is altered by expression of dominant negative RhoA in ameloblasts. *Cells Tissues Organs*. 2011;194(2-4):227-31.
- Lin HM, Nakamura H, Noda T, Ozawa H. Localization of H(+)-ATPase and carbonic anhydrase II in ameloblasts at maturation. *Calcif Tissue Int*. 1994;55(1):38-45.
- Linde A. Dentin mineralization and the role of odontoblasts in calcium transport. *Connect Tissue Res*. 1995;33(1-3):163-70.
- Liu JL, Xia T, Yu YY, Sun XZ, Zhu Q, He W, et al. [The dose-effect relationship of water fluoride levels and renal damage in children]. *Wei Sheng Yan Jiu*. 2005;34(3):287-8.
- Lochter A, Galosy S, Muschler J, Freedman N, Werb Z, Bissell MJ. Matrix metalloproteinase stromelysin-1 triggers a cascade of molecular alterations that leads to stable epithelial-to-mesenchymal conversion and a premalignant phenotype in mammary epithelial cells. *J Cell Biol*. 1997;139(7):1861-72.
- Lu X, Ito Y, Kulkarni A, Gibson C, Luan X, Diekwisch TG. Ameloblastin-rich enamel matrix favors short and randomly oriented apatite crystals. *Eur J Oral Sci*. 2011;119 Suppl 1:254-60.

- Lu Y, Papagerakis P, Yamakoshi Y, Hu JC, Bartlett JD, Simmer JP. Functions of KLK4 and MMP-20 in dental enamel formation. *Biol Chem*. 2008;389(6):695-700.
- Ludlow M, Luxton G, Mathew T. Effects of fluoridation of community water supplies for people with chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant*. 2007;22(10):2763-7.
- Luo W, Wen X, Wang HJ, MacDougall M, Snead ML, Paine ML. In vivo overexpression of tuftelin in the enamel organic matrix. *Cells Tissues Organs*. 2004;177(4):212-20.
- Lyaruu DM, Alberga JM, Kwee NC, Bervoets TJ, Bronckers AL, DenBesten PK. Fate of fluoride-induced subameloblastic cysts in developing hamster molar tooth germs. *Arch Oral Biol*. 2011;56(3):238-43.
- Lyaruu DM, Bervoets TJ, Bronckers AL. Short exposure to high levels of fluoride induces stage-dependent structural changes in ameloblasts and enamel mineralization. *Eur J Oral Sci*. 2006;114 Suppl 1:111-5; discussion 27-9, 380.
- Lyaruu DM, Bronckers AL, Mulder L, Mardones P, Medina JF, Kellokumpu S, et al. The anion exchanger Ae2 is required for enamel maturation in mouse teeth. *Matrix Biol*. 2008;27(2):119-27.
- Lyaruu DM, de Jong M, Bronckers AL, Woltgens JH. Ultrastructure of in-vitro recovery of mineralization capacity of fluorotic enamel matrix in hamster tooth germs pre-exposed to fluoride in organ culture during the secretory phase of amelogenesis. *Arch Oral Biol*. 1987;32(2):107-15.
- Lyaruu DM, Lenglet WJ, Woltgens JH, Bronckers AL. Micro-PIGE determination of fluorine distribution in developing hamster tooth germs. *J Histochem Cytochem*. 1989;37(5):581-7.
- Lyaruu DM, Tros GH, Bronckers AL, Woltgens JH. Micro-PIXE (proton-induced X-ray emission) study of the effects of fluoride on mineral distribution patterns in enamel and dentin in the developing hamster tooth germ. *Scanning Microsc*. 1990;4(2):315-22.
- Lyaruu DM, Vermeulen L, Stienen N, Bervoets TJ, Denbesten PK, Bronckers AL. Enamel pits in hamster molars, formed by a single high fluoride dose, are associated with a perturbation of transitional stage ameloblasts. *Caries Res*. 2012;46(6):575-80.
- Lynch CC, Vargo-Gogola T, Matrisian LM, Fingleton B. Cleavage of E-Cadherin by Matrix Metalloproteinase-7 Promotes Cellular Proliferation in Nontransformed Cell Lines via Activation of RhoA. *J Oncol*. 2010;2010:530745.

Ma Y, Hendershot LM. ER chaperone functions during normal and stress conditions. *J Chem Neuroanat.* 2004;28(1-2):51-65.

Mabelya L, van 't Hof MA, Konig KG, van Palenstein Helderman WH. Comparison of two indices of dental fluorosis in low, moderate and high fluorosis Tanzanian populations. *Community Dent Oral Epidemiol.* 1994;22(6):415-20.

Maddatu TP, Grubb SC, Bult CJ, Bogue MA. Mouse Phenome Database (MPD). *Nucleic Acids Res.* 2012;40(Database issue):D887-94.

Mandel ID, Kutscher A, Denning CR, Thompson RH, Jr., Zegarelli EV. Salivary studies in cystic fibrosis. *Am J Dis Child.* 1967;113(4):431-8.

Mann M, Hojrup P, Roepstorff P. Use of mass spectrometric molecular weight information to identify proteins in sequence databases. *Biol Mass Spectrom.* 1993;22(6):338-45.

Martinou JC, Youle RJ. Mitochondria in apoptosis: Bcl-2 family members and mitochondrial dynamics. *Dev Cell.* 2011;21(1):92-101.

Masuya H, Shimizu K, Sezutsu H, Sakuraba Y, Nagano J, Shimizu A, et al. Enamelin (Enam) is essential for amelogenesis: ENU-induced mouse mutants as models for different clinical subtypes of human amelogenesis imperfecta (AI). *Hum Mol Genet.* 2005;14(5):575-83.

Matsuo S, Inai T, Kurisu K, Kiyomiya K, Kurebe M. Influence of fluoride on secretory pathway of the secretory ameloblast in rat incisor tooth germs exposed to sodium fluoride. *Arch Toxicol.* 1996;70(7):420-9.

McAlear SD, Liu X, Williams JB, McNicholas-Bevensee CM, Bevensee MO. Electrogenic Na/HCO₃ cotransporter (NBCe1) variants expressed in *Xenopus* oocytes: functional comparison and roles of the amino and carboxy termini. *J Gen Physiol.* 2006;127(6):639-58.

McGuire JK, Li Q, Parks WC. Matrilysin (matrix metalloproteinase-7) mediates E-cadherin ectodomain shedding in injured lung epithelium. *Am J Pathol.* 2003;162(6):1831-43.

McKee MD, Zerounian C, Martineau-Doize B, Warshawsky H. Specific binding sites for transferrin on ameloblasts of the enamel maturation zone in the rat incisor. *Anat Rec.* 1987;218(2):123-7.

Medina JF, Lecanda J, Acin A, Ciesielczyk P, Prieto J. Tissue-specific N-terminal isoforms from overlapping alternate promoters of the human AE2 anion exchanger gene. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;267(1):228-35.

Mhawech P. 14-3-3 proteins--an update. *Cell Res.* 2005;15(4):228-36.

Milhaud GE, Charles E, Loubiere ML, Kolf-Clauw M, Joubert C. Effects of fluoride on secretory and postsecretory phases of enamel formation in sheep molars. *Am J Vet Res.* 1992;53(7):1241-7.

Miyazaki Y, Sakai H, Shibata Y, Shibata M, Mataka S, Kato Y. Expression and localization of ferritin mRNA in ameloblasts of rat incisor. *Arch Oral Biol.* 1998;43(5):367-78.

Moffatt P, Smith CE, Sooknanan R, St-Arnaud R, Nanci A. Identification of secreted and membrane proteins in the rat incisor enamel organ using a signal-trap screening approach. *Eur J Oral Sci.* 2006a;114 Suppl 1:139-46; discussion 64-5, 380-1.

Moffatt P, Smith CE, St-Arnaud R, Nanci A. Characterization of Apin, a secreted protein highly expressed in tooth-associated epithelia. *J Cell Biochem.* 2008;103(3):941-56.

Moffatt P, Smith CE, St-Arnaud R, Simmons D, Wright JT, Nanci A. Cloning of rat amelotin and localization of the protein to the basal lamina of maturation stage ameloblasts and junctional epithelium. *Biochem J.* 2006b;399(1):37-46.

Monsour PA, Harbrow DJ, Warshawsky H. Effects of acute doses of sodium fluoride on the morphology and the detectable calcium associated with secretory ameloblasts in rat incisors. *J Histochem Cytochem.* 1989;37(4):463-71.

Moradian-Oldak J. Amelogenins: assembly, processing and control of crystal morphology. *Matrix Biol.* 2001;20(5-6):293-305.

Moradian-Oldak J. Protein-mediated enamel mineralization. *Front Biosci (Landmark Ed).* 2012;17:1996-2023.

Mornstad H, Hammarstrom L. Morphologic changes in the rat enamel organ following a single intraperitoneal injection of sodium fluoride. *Scand J Dent Res.* 1978;86(4):211-20.

Mousny M, Banse X, Wise L, Everett ET, Hancock R, Vieth R, et al. The genetic influence on bone susceptibility to fluoride. *Bone.* 2006;39(6):1283-9.

Mousny M, Omelon S, Wise L, Everett ET, Dumitriu M, Holmyard DP, et al. Fluoride effects on bone formation and mineralization are influenced by genetics. *Bone.* 2008;43(6):1067-74.

Nagai R, Kooh SW, Balfe JW, Fenton T, Halperin ML. Renal tubular acidosis and osteopetrosis with carbonic anhydrase II deficiency: pathogenesis of impaired acidification. *Pediatr Nephrol*. 1997;11(5):633-6.

Nagano T, Kakegawa A, Yamakoshi Y, Tsuchiya S, Hu JC, Gomi K, et al. Mmp-20 and Klk4 cleavage site preferences for amelogenin sequences. *J Dent Res*. 2009;88(9):823-8.

Nagata K, Saga S, Yamada KM. A major collagen-binding protein of chick embryo fibroblasts is a novel heat shock protein. *J Cell Biol*. 1986 Jul;103(1):223-9.

Nanci, A. *Histologia Geral*. Ed. 7a. Rio de Janeiro: Elsevier editora Ltda; 2008.

Nathke IS, Hinck L, Swedlow JR, Papkoff J, Nelson WJ. Defining interactions and distributions of cadherin and catenin complexes in polarized epithelial cells. *J Cell Biol*. 1994;125(6):1341-52.

Nelson DG, Coote GE, Vickridge IC, Suckling G. Proton microprobe determination of fluorine profiles in the enamel and dentine of erupting incisors from sheep given low and high daily doses of fluoride. *Arch Oral Biol*. 1989;34(6):419-29.

Nelson DL, Cox MM. *Lehninger princípios de bioquímica*. 3a ed. ed. São Paulo: Sarvier; 2002.

Nishikawa S, Fujiwara K, Kitamura H. Formation of the tooth enamel rod pattern and the cytoskeletal organization in secretory ameloblasts of the rat incisor. *Eur J Cell Biol*. 1988;47(2):222-32.

Nishikawa S, Josephsen K. Cyclic localization of actin and its relationship to junctional complexes in maturation ameloblasts of the rat incisor. *Anat Rec*. 1987;219(1):21-31.

Nishikawa S, Sasaki F. DNA localization in nuclear fragments of apoptotic ameloblasts using anti-DNA immunoelectron microscopy: programmed cell death of ameloblasts. *Histochem Cell Biol*. 1995;104(2):151-9.

Nordlund AL, Ekstrand JL, Hammarstrom L. Fluoride-induced cystic changes in the enamel organ of the rat molar. *J Oral Pathol*. 1986;15(2):87-92.

Nordlund AL, Lindskog S. Scanning electron microscopy of fluoride-induced disturbances on the enamel surface of rat molars. *Scand J Dent Res*. 1986;94(3):185-92.

O'Farrell PH. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem*. 1975;250(10):4007-21.

Ohazama A, Courtney JM, Sharpe PT. Opg, Rank, and Rankl in tooth development: co-ordination of odontogenesis and osteogenesis. *J Dent Res.* 2004;83(3):241-4.

Okazaki M, Takahashi J, Kimura H. Iron uptake of hydroxyapatite. *J Osaka Univ Dent Sch.* 1985;25:17-24.

Okumura R, Shibukawa Y, Muramatsu T, Hashimoto S, Nakagawa K, Tazaki M, et al. Sodium-calcium exchangers in rat ameloblasts. *J Pharmacol Sci.* 2010;112(2):223-30.

Ono T, Miyazaki T, Ishida Y, Uehata M, Nagata K. Direct in vitro and in vivo evidence for interaction between Hsp47 protein and collagen triple helix. *J Biol Chem.* 2012 Feb 24;287(9):6810-8. Orrenius S, Zhivotovsky B, Nicotera P. Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003;4(7):552-65.

Ozdemir D, Hart PS, Ryu OH, Choi SJ, Ozdemir-Karatas M, Firatli E, et al. MMP20 active-site mutation in hypomaturation amelogenesis imperfecta. *J Dent Res.* 2005;84(11):1031-5.

Paine ML, Luo W, Wang HJ, Bringas P, Jr., Ngan AY, Miklus VG, et al. Dentin sialoprotein and dentin phosphoprotein overexpression during amelogenesis. *J Biol Chem.* 2005;280(36):31991-8.

Paine ML, Snead ML, Wang HJ, Abuladze N, Pushkin A, Liu W, et al. Role of NBCe1 and AE2 in secretory ameloblasts. *J Dent Res.* 2008;87(4):391-5.

Paine ML, White SN, Luo W, Fong H, Sarikaya M, Snead ML. Regulated gene expression dictates enamel structure and tooth function. *Matrix Biol.* 2001;20(5-6):273-92.

Paine R, 3rd, Wilcoxon SE, Morris SB, Sartori C, Baleeiro CE, Matthay MA, et al. Transgenic overexpression of granulocyte macrophage-colony stimulating factor in the lung prevents hyperoxic lung injury. *Am J Pathol.* 2003;163(6):2397-406.

Palacios J, Benito N, Berraquero R, Pizarro A, Cano A, Gamallo C. Differential spatiotemporal expression of E- and P-cadherin during mouse tooth development. *Int J Dev Biol.* 1995;39(4):663-6.

Pan P, Leppilampi M, Pastorekova S, Pastorek J, Waheed A, Sly WS, et al. Carbonic anhydrase gene expression in CA II-deficient (Car2^{-/-}) and CA IX-deficient (Car9^{-/-}) mice. *J Physiol.* 2006;571(Pt 2):319-27.

Pancholi V. Multifunctional alpha-enolase: its role in diseases. *Cell Mol Life Sci.* 2001;58(7):902-20.

Pandey A, Mann M. Proteomics to study genes and genomes. *Nature*. 2000;405(6788):837-46.

Papagerakis P, Lin HK, Lee KY, Hu Y, Simmer JP, Bartlett JD, et al. Premature stop codon in MMP20 causing amelogenesis imperfecta. *J Dent Res*. 2008;87(1):56-9.

Park JC, Park JT, Son HH, Kim HJ, Jeong MJ, Lee CS, et al. The amyloid protein APin is highly expressed during enamel mineralization and maturation in rat incisors. *Eur J Oral Sci*. 2007;115(2):153-60.

Partanen AM, Ekblom P, Thesleff I. Epidermal growth factor inhibits morphogenesis and cell differentiation in cultured mouse embryonic teeth. *Dev Biol*. 1985;111(1):84-94.

Partanen AM, Thesleff I, Ekblom P. Transferrin is required for early tooth morphogenesis. *Differentiation*. 1984;27(1):59-66.

Partanen AM, Thesleff I. Levels and patterns of 125I-labeled transferrin binding in mouse embryonic teeth and kidneys at various developmental stages. *Differentiation*. 1987a;34(1):18-24.

Partanen AM, Thesleff I. Transferrin and tooth morphogenesis: retention of transferrin by mouse embryonic teeth in organ culture. *Differentiation*. 1987b;34(1):25-31.

Pastorekova S, Parkkila S, Pastorek J, Supuran CT. Carbonic anhydrases: current state of the art, therapeutic applications and future prospects. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 2004;19(3):199-229.

Payne TL, Postlethwait JH, Yelick PC. Functional characterization and genetic mapping of *alk8*. *Mech Dev*. 2001;100(2):275-89.

Payne TL, Skobe Z, Yelick PC. Regulation of tooth development by the novel type I TGFbeta family member receptor *Alk8*. *J Dent Res*. 2001;80(11):1968-73.

Payne-Ferreira TL, Yelick PC. *Alk8* is required for neural crest cell formation and development of pharyngeal arch cartilages. *Dev Dyn*. 2003;228(4):683-96.

Peng L, Li Y, Shusterman K, Kuehl M, Gibson CW. Wnt-RhoA signaling is involved in dental enamel development. *Eur J Oral Sci*. 2011;119 Suppl 1:41-9.

Perrino MA, Yelick PC. Immunolocalization of *Alk8* during replacement tooth development in zebrafish. *Cells Tissues Organs*. 2004;176(1-3):17-27.

Pereira, HABS. A análise proteômica em fígados de ratos submetidos à exposição crônica ao flúor. [dissertação]. Bauru (SP): Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo; 2011.

Piepenhagen PA, Nelson WJ. Defining E-cadherin-associated protein complexes in epithelial cells: plakoglobin, beta- and gamma-catenin are distinct components. *J Cell Sci.* 1993;104 (Pt 3):751-62.

Pindborg JJ. The pigmentation of the rat incisor as an index of metabolic disturbances. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1953;6(6):780-9.

Porteus B, Kocharunchitt C, Nilsson RE, Ross T, Bowman JP. Utility of gel-free, label-free shotgun proteomics approaches to investigate microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2011;90(2):407-16.

Porto IM, Line SR, Laure HJ, Gerlach RF. Comparison of three methods for enamel protein extraction in different developmental phases of rat lower incisors. *Eur J Oral Sci.* 2006;114 Suppl 1:272-5; discussion 85-6, 382.

Primosch RE. Dental and skeletal maturation in patients with cystic fibrosis. *J Oral Med.* 1980a;35(1):7-13.

Primosch RE. Tetracycline discoloration, enamel defects, and dental caries in patients with cystic fibrosis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1980b;50(4):301-8.

Pugach MK, Li Y, Suggs C, Wright JT, Aragon MA, Yuan ZA, et al. The amelogenin C-terminus is required for enamel development. *J Dent Res.* 2010;89(2):165-9.

Pushkin A, Kurtz I. SLC4 base (HCO_3^- , CO_3^{2-}) transporters: classification, function, structure, genetic diseases, and knockout models. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2006;290(3):F580-99.

Qiu RG, Chen J, McCormick F, Symons M. A role for Rho in Ras transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92(25):11781-5.

Quednau BD, Nicoll DA, Philipson KD. The sodium/calcium exchanger family-SLC8. *Pflugers Arch.* 2004;447(5):543-8.

Rao RV, Bredesen DE. Misfolded proteins, endoplasmic reticulum stress and neurodegeneration. *Curr Opin Cell Biol.* 2004;16(6):653-62.

Rauth RJ, Potter KS, Ngan AY, Saad DM, Mehr R, Luong VQ, et al. Dental enamel: genes define biomechanics. *J Calif Dent Assoc.* 2009;37(12):863-8.

Ravindranath HH, Chen LS, Zeichner-David M, Ishima R, Ravindranath RM. Interaction between the enamel matrix proteins amelogenin and ameloblastin. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;323(3):1075-83.

Reinders J, Sickmann A. *Proteomics: Methods and protocols.* New York: Humana Press; 2002.

Reith EJ. The ultrastructure of ameloblasts during matrix formation and the maturation of enamel. *J Biophys Biochem Cytol.* 1961;9:825-39.

Retief DH, Cleaton-Jones PE, Turkstra J, De Wet WJ. The quantitative analysis of sixteen elements in normal human enamel and dentine by neutron activation analysis and high-resolution gamma-spectrometry. *Arch Oral Biol.* 1971;16(11):1257-67.

Richards A, Fejerskov O, Baelum V. Enamel fluoride in relation to severity of human dental fluorosis. *Adv Dent Res.* 1989;3(2):147-53.

Richards A, Kragstrup J, Josephsen K, Fejerskov O. Dental fluorosis developed in post-secretory enamel. *J Dent Res.* 1986;65(12):1406-9.

Richards A, Kragstrup J, Nielsen-Kudsk F. Pharmacokinetics of chronic fluoride ingestion in growing pigs. *J Dent Res.* 1985;64(3):425-30.

Richards A, Likimani S, Baelum V, Fejerskov O. Fluoride concentrations in unerupted fluorotic human enamel. *Caries Res.* 1992;26(5):328-32.

Richards A. Nature and mechanisms of dental fluorosis in animals. *J Dent Res.* 1990;69 Spec No:701-5; discussion 21.

Rickards O, Martinez-Labarga C, Trucchi E, Renzi F, Casalotti R, Babalini C, et al. Restriction fragment length polymorphisms of type I collagen locus 2 (COL1A2) in two communities of African ancestry and other mixed populations of northwestern Ecuador. *Hum Biol.* 2005;77(1):115-23.

Ridley AJ, Hall A. The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell.* 1992;70(3):389-99.

Rimm DL, Koslov ER, Kebriaei P, Cianci CD, Morrow JS. Alpha 1(E)-catenin is an actin-binding and -bundling protein mediating the attachment of F-actin to the membrane adhesion complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(19):8813-7.

Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science*. 1989;245(4922):1066-73.

Rizzuto R, Duchen MR, Pozzan T. Flirting in little space: the ER/mitochondria Ca²⁺ liaison. *Sci STKE*. 2004;2004(215):re1.

Robinson C, Brookes SJ, Shore RC, Kirkham J. The developing enamel matrix: nature and function. *Eur J Oral Sci*. 1998;106 Suppl 1:282-91.

Robinson C, Connell S, Kirkham J, Brookes SJ, Shore RC, Smith AM. The effect of fluoride on the developing tooth. *Caries Res*. 2004;38(3):268-76.

Robinson C, Hudson J. Tuft protein: protein cross-linking in enamel development. *Eur J Oral Sci*. 2011;119 Suppl 1:50-4.

Robinson C, Kirkham J. The effect of fluoride on the developing mineralized tissues. *J Dent Res*. 1990;69 Spec No:685-91; discussion 721.

Robinson C, Yamamoto K, Connell SD, Kirkham J, Nakagaki H, Smith AD. The effects of fluoride on the nanostructure and surface pK of enamel crystals: an atomic force microscopy study of human and rat enamel. *Eur J Oral Sci*. 2006;114 Suppl 1:99-104; discussion 27-9, 380.

Rogers MB. Receptor-selective retinoids implicate retinoic acid receptor alpha and gamma in the regulation of bmp-2 and bmp-4 in F9 embryonal carcinoma cells. *Cell Growth Differ*. 1996;7(1):115-22.

Ron D, Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8(7):519-29.

Ruan Q, Zhang Y, Yang X, Nutt S, Moradian-Oldak J. An amelogenin-chitosan matrix promotes assembly of an enamel-like layer with a dense interface. *Acta Biomater*. 2013;9(7):7289-97.

Russell AL. Dental fluorosis in Grand Rapids during the seventeenth year of fluoridation. *J Am Dent Assoc*. 1962;65:608-12.

Ryu OH, Fincham AG, Hu CC, Zhang C, Qian Q, Bartlett JD, et al. Characterization of recombinant pig enamelysin activity and cleavage of recombinant pig and mouse amelogenins. *J Dent Res.* 1999;78(3):743-50.

Ryu OH, Hu CC, Simmer JP. Biochemical characterization of recombinant mouse amelogenins: protein quantitation, proton absorption, and relative affinity for enamel crystals. *Connect Tissue Res.* 1998;38(1-4):207-14; discussion 41-6.

Saga S, Nagata K, Chen WT, Yamada KM. pH-dependent function, purification, and intracellular location of a major collagen-binding glycoprotein. *J Cell Biol.* 1987 Jul;105(1):517-27.

Salama AH, Bailey RL, Eisenmann DR, Zaki AE. Quantitative cytochemistry of lysosomal structures in rat incisor maturation enamel organ. *Arch Oral Biol.* 1990;35(7):535-9.

Salama AH, Zaki AE, Eisenmann DR. Fine structural changes and lysosomal phosphatase cytochemistry of ameloblasts associated with the transitional stage of enamel formation in the rat incisor. *Am J Anat.* 1991;190(3):279-90.

Sasaki S, Takagi T, Suzuki M. Cyclical changes in pH in bovine developing enamel as sequential bands. *Arch Oral Biol.* 1991;36(3):227-31.

Sasaki T, Tadokoro K, Yanagisawa T, Higashi S, Garant PR. H⁺-K⁺-ATPase activity in the rat incisor enamel organ during enamel formation. *Anat Rec.* 1988;221(4):823-33.

Sasaki T. Differentiation and functions of osteoclasts and odontoclasts in mineralized tissue resorption. *Microsc Res Tech.* 2003;61(6):483-95.

Schnetkamp PP, Basu DK, Szerencsei RT. Na⁺-Ca²⁺ exchange in bovine rod outer segments requires and transports K⁺. *Am J Physiol.* 1989;257(1 Pt 1):C153-7.

Schnetkamp PP. The SLC24 Na⁺/Ca²⁺-K⁺ exchanger family: vision and beyond. *Pflugers Arch.* 2004;447(5):683-8.

Schroder M, Kaufman RJ. ER stress and the unfolded protein response. *Mutat Res.* 2005;569(1-2):29-63.

Schulze WX, Usadel B. Quantitation in mass-spectrometry-based proteomics. *Annu Rev Plant Biol.* 2010;61:491-516.

Seltmann K, Roth W, Kroger C, Loschke F, Lederer M, Huttelmaier S, et al. Keratins mediate localization of hemidesmosomes and repress cell motility. *J Invest Dermatol*. 2013;133(1):181-90.

Sferra TJ, Collins FS. The molecular biology of cystic fibrosis. *Annu Rev Med*. 1993;44:133-44.

Shanthakumari D, Srinivasalu S, Subramanian S. Effect of fluoride intoxication on lipidperoxidation and antioxidant status in experimental rats. *Toxicology*. 2004;204(2-3):219-28.

Sharma R, Tsuchiya M, Bartlett JD. Fluoride induces endoplasmic reticulum stress and inhibits protein synthesis and secretion. *Environ Health Perspect*. 2008;116(9):1142-6.

Sharma R, Tsuchiya M, Skobe Z, Tannous BA, Bartlett JD. The acid test of fluoride: how pH modulates toxicity. *PLoS One*. 2010;5(5):e10895.

Sharma R, Tye CE, Arun A, MacDonald D, Chatterjee A, Abrazinski T, et al. Assessment of dental fluorosis in Mmp20 +/- mice. *J Dent Res*. 2011;90(6):788-92.

Shen X, Zhang K, Kaufman RJ. The unfolded protein response--a stress signaling pathway of the endoplasmic reticulum. *J Chem Neuroanat*. 2004;28(1-2):79-92.

Shevchenko A, Tomas H, Havlis J, Olsen JV, Mann M. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat Protoc*. 2006;1(6):2856-60.

Shinoda H, Ogura H. Scanning electron microscopical study on the fluorosis of enamel in rats. *Calcif Tissue Res*. 1978;25(1):75-83.

Shinoda H. Effect of long-term administration of fluoride on physico-chemical properties of the rat incisor enamel. *Calcif Tissue Res*. 1975;18(2):91-100.

Sierant ML, Bartlett JD. Stress Response Pathways in Ameloblasts: Implications for Amelogenesis and Dental Fluorosis. *Cells*. 2012;1(3):631-45.

Simmer JP, Fincham AG. Molecular mechanisms of dental enamel formation. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1995;6(2):84-108.

Simmer JP, Hu JC. Dental enamel formation and its impact on clinical dentistry. *J Dent Educ*. 2001;65(9):896-905.

Simmer JP, Hu JC. Expression, structure, and function of enamel proteinases. *Connect Tissue Res.* 2002;43(2-3):441-9.

Simmer JP, Hu Y, Lertlam R, Yamakoshi Y, Hu JC. Hypomaturation enamel defects in *Klk4* knockout/*LacZ* knockin mice. *J Biol Chem.* 2009;284(28):19110-21.

Simmer JP, Hu Y, Richardson AS, Bartlett JD, Hu JC. Why does enamel in *Klk4*-null mice break above the dentino-enamel junction? *Cells Tissues Organs.* 2011a;194(2-4):211-5.

Simmer JP, Papagerakis P, Smith CE, Fisher DC, Rountrey AN, Zheng L, et al. Regulation of dental enamel shape and hardness. *J Dent Res.* 2010;89(10):1024-38.

Simmer JP, Richardson AS, Hu YY, Smith CE, Ching-Chun Hu J. A post-classical theory of enamel biomineralization... and why we need one. *Int J Oral Sci.* 2012;4(3):129-34.

Simmer JP, Richardson AS, Smith CE, Hu Y, Hu JC. Expression of kallikrein-related peptidase 4 in dental and non-dental tissues. *Eur J Oral Sci.* 2011b;119 Suppl 1:226-33.

Sly WS, Hu PY. Human carbonic anhydrases and carbonic anhydrase deficiencies. *Annu Rev Biochem.* 1995;64:375-401.

Smid JR, Monsour PA, Harbrow DJ, Young WG. A histochemical study of the effects of high doses of sodium fluoride on dipeptidyl peptidase II activity in the rat incisor ameloblast. *Arch Oral Biol.* 1990;35(8):671-5.

Smith CE, Issid M, Margolis HC, Moreno EC. Developmental changes in the pH of enamel fluid and its effects on matrix-resident proteinases. *Adv Dent Res.* 1996;10(2):159-69.

Smith CE, Nanci A, Denbesten PK. Effects of chronic fluoride exposure on morphometric parameters defining the stages of amelogenesis and ameloblast modulation in rat incisors. *Anat Rec.* 1993;237(2):243-58.

Smith CE, Nanci A, Moffatt P. Evidence by signal peptide trap technology for the expression of carbonic anhydrase 6 in rat incisor enamel organs. *Eur J Oral Sci.* 2006;114 Suppl 1:147-53; discussion 64-5, 380-1.

Smith CE, Nanci A. Protein dynamics of amelogenesis. *Anat Rec.* 1996;245(2):186-207.

Smith CE, Richardson AS, Hu Y, Bartlett JD, Hu JC, Simmer JP. Effect of kallikrein 4 loss on enamel mineralization: comparison with mice lacking matrix metalloproteinase 20. *J Biol Chem.* 2011;286(20):18149-60.

Smith CE, Warshawsky H. Quantitative analysis of cell turnover in the enamel organ of the rat incisor. Evidence for ameloblast death immediately after enamel matrix secretion. *Anat Rec.* 1977;187(1):63-98.

Smith CE, Wazen R, Hu Y, Zalzal SF, Nanci A, Simmer JP, et al. Consequences for enamel development and mineralization resulting from loss of function of ameloblastin or enamelin. *Eur J Oral Sci.* 2009;117(5):485-97.

Smith CE. Cellular and chemical events during enamel maturation. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1998;9(2):128-61.

Sok J, Wang XZ, Batchvarova N, Kuroda M, Harding H, Ron D. CHOP-Dependent stress-inducible expression of a novel form of carbonic anhydrase VI. *Mol Cell Biol.* 1999;19(1):495-504.

Solloway MJ, Robertson EJ. Early embryonic lethality in Bmp5;Bmp7 double mutant mice suggests functional redundancy within the 60A subgroup. *Development.* 1999;126(8):1753-68.

Solomon A, Murphy CL, Weaver K, Weiss DT, Hrnčić R, Eulitz M, et al. Calcifying epithelial odontogenic (Pindborg) tumor-associated amyloid consists of a novel human protein. *J Lab Clin Med.* 2003;142(5):348-55.

Somogyi-Ganss E, Nakayama Y, Iwasaki K, Nakano Y, Stolf D, McKee MD, et al. Comparative temporospatial expression profiling of murine amelotin protein during amelogenesis. *Cells Tissues Organs.* 2012;195(6):535-49.

Stahl J, Nakano Y, Kim SO, Gibson CW, Le T, Denbesten P. Leucine rich amelogenin peptide alters ameloblast differentiation in vivo. *Matrix Biol.* 2013.

Stirnimann G, Kessebohm K, Lauterburg B. Liver injury caused by drugs: an update. *Swiss Med Wkly.* 2010;140:w13080.

Strisciuglio P, Sartorio R, Pecoraro C, Lotito F, Sly WS. Variable clinical presentation of carbonic anhydrase deficiency: evidence for heterogeneity? *Eur J Pediatr.* 1990;149(5):337-40.

Suckling G, Thurley DC, Nelson DG. The macroscopic and scanning electron-microscopic appearance and microhardness of the enamel, and the related histological changes in the enamel organ of erupting sheep incisors resulting from a prolonged low daily dose of fluoride. *Arch Oral Biol.* 1988;33(5):361-73.

Sugimoto T, Ogawa Y, Kuwahara H, Shimazaki M, Yagi T, Sakai A. Histochemical demonstration of carbonic anhydrase activity in the odontogenic cells of the rat incisor. *J Dent Res.* 1988;67(10):1271-4.

Sui W, Boyd C, Wright JT. Altered pH regulation during enamel development in the cystic fibrosis mouse incisor. *J Dent Res.* 2003;82(5):388-92.

Sundstrom B, Jongebloed WL, Arends J. Fluorosed human enamel. A SEM investigation of the anatomical surface and outer and inner regions of mildly fluorosed enamel. *Caries Res.* 1978;12(6):329-38.

Supuran CT. Carbonic anhydrases--an overview. *Curr Pharm Des.* 2008;14(7):603-14.

Susheela AK, Bhatnagar M. Fluoride toxicity: a biochemical and scanning electron microscopic study of enamel surface of rabbit teeth. *Arch Toxicol.* 1993;67(8):573-9.

Suuriniemi M, Mahonen A, Kovanen V, Alen M, Cheng S. Relation of PvuII site polymorphism in the COL1A2 gene to the risk of fractures in prepubertal Finnish girls. *Physiol Genomics.* 2003;14(3):217-24.

Taguchi T, Razzaque MS. The collagen-specific molecular chaperone HSP47: is there a role in fibrosis? *Trends Mol Med.* 2007 Feb;13(2):45-53. Epub 2006 Dec 13.

Takagi T, Ogasawara T, Tagami J, Akao M, Kuboki Y, Nagai N, et al. pH and carbonate levels in developing enamel. *Connect Tissue Res.* 1998;38(1-4):181-7; discussion 201-5.

Takechi H, Hirayoshi K, Nakai A, Kudo H, Saga S, Nagata K. Molecular cloning of a mouse 47-kDa heat-shock protein (HSP47), a collagen-binding stress protein, and its expression during the differentiation of F9 teratocarcinoma cells. *Eur J Biochem.* 1992;206(2):323-9. Tan J, Leung W, Moradian-Oldak J, Zeichner-David M, Fincham AG. Quantitative analysis of amelogenin solubility. *J Dent Res.* 1998;77(6):1388-96.

Tanabe T, Aoba T, Moreno EC, Fukae M. Effect of fluoride in the apatitic lattice on adsorption of enamel proteins onto calcium apatites. *J Dent Res.* 1988;67(3):536-42.

Tanimoto K, Le T, Zhu L, Chen J, Featherstone JD, Li W, et al. Effects of fluoride on the interactions between amelogenin and apatite crystals. *J Dent Res.* 2008;87(1):39-44.

Taves DR. Determination of submicromolar concentrations of fluoride in biological samples. *Talanta.* 1968;15(10):1015-23.

- Terry S, Nie M, Matter K, Balda MS. Rho signaling and tight junction functions. *Physiology (Bethesda)*. 2010;25(1):16-26.
- Thesleff I, Nieminen P. Tooth morphogenesis and cell differentiation. *Curr Opin Cell Biol*. 1996;8(6):844-50.
- Thesleff I. Developmental biology and building a tooth. *Quintessence Int*. 2003;34(8):613-20.
- Thiede B, Hohenwarter W, Krah A, Mattow J, Schmid M, Schmidt F, et al. Peptide mass fingerprinting. *Methods*. 2005;35(3):237-47.
- Thomson CA, Ananthanarayanan VS. Structure-function studies on hsp47: pH-dependent inhibition of collagen fibril formation in vitro. *Biochem J*. 2000;349 Pt 3:877-83.
- Thongboonkerd V. Proteomics in nephrology: current status and future directions. *Am J Nephrol*. 2004;24(3):360-78.
- Thylstrup A, Fejerskov O. Clinical appearance of dental fluorosis in permanent teeth in relation to histologic changes. *Community Dent Oral Epidemiol*. 1978;6(6):315-28.
- Tian H, Lu P, Zhou CY, Gao XJ. [Expression patterns of amelogenin and enamelin in developing mouse tooth germs]. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi*. 2012;47(3):173-6.
- Toyosawa S, Ogawa Y, Inagaki T, Ijuhin N. Immunohistochemical localization of carbonic anhydrase isozyme II in rat incisor epithelial cells at various stages of amelogenesis. *Cell Tissue Res*. 1996;285(2):217-25.
- Triller M. Structural and histochemical observations of fluorotic enamel matrix. *J Dent Res*. 1979;58(Spec Issue B):1028-9.
- Tsumura M, Okumura R, Tatsuyama S, Ichikawa H, Muramatsu T, Matsuda T, et al. Ca²⁺ extrusion via Na⁺-Ca²⁺ exchangers in rat odontoblasts. *J Endod*. 2010;36(4):668-74.
- Tu BP, Weissman JS. Oxidative protein folding in eukaryotes: mechanisms and consequences. *J Cell Biol*. 2004;164(3):341-6.
- Turnbull CI, Looi K, Mangum JE, Meyer M, Sayer RJ, Hubbard MJ. Calbindin independence of calcium transport in developing teeth contradicts the calcium ferry dogma. *J Biol Chem*. 2004;279(53):55850-4.

Tye CE, Antone JV, Bartlett JD. Fluoride does not inhibit enamel protease activity. *J Dent Res.* 2011;90(4):489-94.

Tye CE, Lorenz RL, Bartlett JD. Lysosomal protease expression in mature enamel. *Cells Tissues Organs.* 2009;189(1-4):111-4.

Uehara A, Iwamoto T, Nakamura Y, Imanaga I. Forefront of Na⁺/Ca²⁺ exchanger studies: physiology and molecular biology of monovalent cation sensitivities in Na⁺/Ca²⁺ exchangers. *J Pharmacol Sci.* 2004;96(1):19-22.

Van Aelst L, Symons M. Role of Rho family GTPases in epithelial morphogenesis. *Genes Dev.* 2002;16(9):1032-54.

Vello MA, Martinez-Costa C, Catala M, Fons J, Brines J, Guijarro-Martinez R. Prenatal and neonatal risk factors for the development of enamel defects in low birth weight children. *Oral Dis.* 2010;16(3):257-62.

Vieira AP, Hancock R, Limeback H, Maia R, Grynpas MD. Is fluoride concentration in dentin and enamel a good indicator of dental fluorosis? *J Dent Res.* 2004;83(1):76-80.

Vieira AP, Hancock R, Eggertsson H, Everett ET, Grynpas MD. Tooth quality in dental fluorosis genetic and environmental factors. *Calcif Tissue Int.* 2005a;76(1):17-25.

Vieira AP, Mousny M, Maia R, Hancock R, Everett ET, Grynpas MD. Assessment of teeth as biomarkers for skeletal fluoride exposure. *Osteoporos Int.* 2005b;16(12):1576-82.

Vlahou A, Fountoulakis M. Proteomic approaches in the search for disease biomarkers. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2005;814(1):11-9.

Walker JE, Fearnley IM, Gay NJ, Gibson BW, Northrop FD, Powell SJ, et al. Primary structure and subunit stoichiometry of F1-ATPase from bovine mitochondria. *J Mol Biol.* 1985;184(4):677-701.

Wall NA, Hogan BL. Expression of bone morphogenetic protein-4 (BMP-4), bone morphogenetic protein-7 (BMP-7), fibroblast growth factor-8 (FGF-8) and sonic hedgehog (SHH) during branchial arch development in the chick. *Mech Dev.* 1995;53(3):383-92.

Walton RE, Eisenmann DR. Ultrastructural examination of various stages of amelogenesis in the rat following parenteral fluoride administration. *Arch Oral Biol.* 1974;19(2):171-82.

Wang H, Tannukit S, Zhu D, Snead ML, Paine ML. Enamel matrix protein interactions. *J Bone Miner Res.* 2005;20(6):1032-40.

Wang X, Suzawa T, Ohtsuka H, Zhao B, Miyamoto Y, Miyauchi T, et al. Carbonic anhydrase II regulates differentiation of ameloblasts via intracellular pH-dependent JNK signaling pathway. *J Cell Physiol.* 2010;225(3):709-19.

Weber D, Yaeger JA. A Microradiographic Interpretation of Abnormal Enamel Formation Induced by Subcutaneous Sodium Fluoride. *J Dent Res.* 1964;43:50-6.

Wei W, Gao Y, Wang C, Zhao L, Sun D. Excessive fluoride induces endoplasmic reticulum stress and interferes enamel proteinases secretion. *Environ Toxicol.* 2013;28(6):332-41.

Wen X, Paine ML. Iron deposition and ferritin heavy chain (Fth) localization in rodent teeth. *BMC Res Notes.* 2013;6:1.

Westermeier R, Naven T. *Proteomics in Practice: A laboratory manual of proteome analysis* - Weinheim: ed. Wiley-VCH; 2002.

Whitford GM. Fluoride, calcium and phosphorus metabolism in the rat: comparison of 'natural ingredient' with semipurified diets. *Arch Oral Biol.* 1991;36(4):291-7.

Whitford GM. The metabolism and toxicity of fluoride. *Monogr Oral Sci.* 1996;16 Rev 2:1-153.

Widmer C, Gebauer JM, Brunstein E, Rosenbaum S, Zaucke F, Drögemüller C, Leeb T, Baumann U. Molecular basis for the action of the collagen-specific chaperone Hsp47/SERPINH1 and its structure-specific client recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012 ;109(33):13243-7

Wilkins MR, Sanchez JC, 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;13:19-50.

Wilkins MR, Williams KR, R.D. A, Hochstrasse DF. *Proteome research: New frontiers in functional genomics, principles and practice.* . Berlin: Springer verlag; 1997.

Williams JE, Zwemer JD. Community water fluoride levels, preschool dietary patterns, and the occurrence of fluoride enamel opacities. *J Public Health Dent.* 1990;50(4):276-81.

- Wright JT, Chen SC, Hall KI, Yamauchi M, Bawden JW. Protein characterization of fluorosed human enamel. *J Dent Res.* 1996a;75(12):1936-41.
- Wright JT, Daly B, Simmons D, Hong S, Hart SP, Hart TC, et al. Human enamel phenotype associated with amelogenesis imperfecta and a kallikrein-4 (g.2142G>A) proteinase mutation. *Eur J Oral Sci.* 2006;114 Suppl 1:13-7; discussion 39-41, 379.
- Wright JT, Hall KI, Grubb BR. Enamel mineral composition of normal and cystic fibrosis transgenic mice. *Adv Dent Res.* 1996;10(2):270-4; discussion 5.
- Wright JT, Hart TC, Hart PS, Simmons D, Suggs C, Daley B, et al. Human and mouse enamel phenotypes resulting from mutation or altered expression of AMEL, ENAM, MMP20 and KLK4. *Cells Tissues Organs.* 2009;189(1-4):224-9.
- Wright JT, Kiefer CL, Hall KI, Grubb BR. Abnormal enamel development in a cystic fibrosis transgenic mouse model. *J Dent Res.* 1996b;75(4):966-73.
- Xu H, Jing L, Li GS. Proteomic analysis of osteoblasts exposed to fluoride in vitro. *Biol Trace Elem Res.* 2008;123(1-3):91-7.
- Xue H, Li Y, Everett ET, Ryan K, Peng L, Porecha R, et al. Ameloblasts require active RhoA to generate normal dental enamel. *Eur J Oral Sci.* 2013;121(4):293-302.
- Yamakoshi Y, Richardson AS, Nunez SM, Yamakoshi F, Milkovich RN, Hu JC, et al. Enamel proteins and proteases in Mmp20 and Klk4 null and double-null mice. *Eur J Oral Sci.* 2011;119 Suppl 1:206-16.
- Yan D, Gurumurthy A, Wright M, Pfeiler TW, Loba EG, Everett ET. Genetic background influences fluoride's effects on osteoclastogenesis. *Bone.* 2007;41(6):1036-44.
- Yan D, Willett TL, Gu XM, Martinez-Mier EA, Sardone L, McShane L, et al. Phenotypic variation of fluoride responses between inbred strains of mice. *Cells Tissues Organs.* 2011;194(2-4):261-7.
- Yan Q, Zhang Y, Li W, Denbesten PK. Micromolar fluoride alters ameloblast lineage cells in vitro. *J Dent Res.* 2007;86(4):336-40.
- Yanagisawa T, Takuma S, Fejerskov O. Ultrastructure and composition of enamel in human dental fluorosis. *Adv Dent Res.* 1989;3(2):203-10.

Yanagisawa T, Takuma S, Tohda H, Fejerskov O, Fearnhead RW. High resolution electron microscopy of enamel crystals in cases of human dental fluorosis. *J Electron Microsc* (Tokyo). 1989;38(6):441-8.

Yang T, Zhang Y, Li Y, Hao Y, Zhou M, Dong N, et al. High amounts of fluoride induce apoptosis/cell death in matured ameloblast-like LS8 cells by downregulating Bcl-2. *Arch Oral Biol*. 2013.

Yang X, Fan D, Matthew S, Moradian-Oldak J. Amelogenin-enamelin association in phosphate-buffered saline. *Eur J Oral Sci*. 2011;119 Suppl 1:351-6.

Yang X, Wang L, Qin Y, Sun Z, Henneman ZJ, Moradian-Oldak J, et al. How amelogenin orchestrates the organization of hierarchical elongated microstructures of apatite. *J Phys Chem B*. 2010;114(6):2293-300.

Yoder KM, Mabelya L, Robison VA, Dunipace AJ, Brizendine EJ, Stookey GK. Severe dental fluorosis in a Tanzanian population consuming water with negligible fluoride concentration. *Community Dent Oral Epidemiol*. 1998;26(6):382-93.

Yoshida T, Kumashiro Y, Iwata T, Ishihara J, Umemoto T, Shiratsuchi Y, et al. Requirement of integrin beta3 for iron transportation during enamel formation. *J Dent Res*. 2012;91(12):1154-9.

Zalzal SF, Smith CE, Nanci A. Ameloblastin and amelogenin share a common secretory pathway and are co-secreted during enamel formation. *Matrix Biol*. 2008;27(4):352-9.

Zhan XA, Wang M, Xu ZR, Li WF, Li JX. Effects of fluoride on hepatic antioxidant system and transcription of Cu/Zn SOD gene in young pigs. *J Trace Elem Med Biol*. 2006;20(2):83-7.

Zhang H, Recker R, Lee WN, Xiao GG. Proteomics in bone research. *Expert Rev Proteomics*. 2010;7(1):103-11.

Zhang X, Diekwisch TG, Luan X. Structure and function of ameloblastin as an extracellular matrix protein: adhesion, calcium binding, and CD63 interaction in human and mouse. *Eur J Oral Sci*. 2011;119 Suppl 1:270-9.

Zhang Y, Li W, Chi HS, Chen J, Denbesten PK. JNK/c-Jun signaling pathway mediates the fluoride-induced down-regulation of MMP-20 in vitro. *Matrix Biol*. 2007;26(8):633-41.

Zhang Y, Yan Q, Li W, DenBesten PK. Fluoride down-regulates the expression of matrix metalloproteinase-20 in human fetal tooth ameloblast-lineage cells in vitro. *Eur J Oral Sci.* 2006;114 Suppl 1:105-10; discussion 27-9, 380.

Zhang Y, Zhang X, Lu X, Atsawasuwan P, Luan X. Ameloblastin regulates cell attachment and proliferation through RhoA and p27. *Eur J Oral Sci.* 2011;119 Suppl 1:280-5.

Zheng L, Seon YJ, Mourao MA, Schnell S, Kim D, Harada H, et al. Circadian rhythms regulate amelogenesis. *Bone.* 2013;55(1):158-65.

Zheng L, Zhang Y, He P, Kim J, Schneider R, Bronckers AL, et al. NBCe1 in mouse and human ameloblasts may be indirectly regulated by fluoride. *J Dent Res.* 2011;90(6):782-7.

Zhou R, Zaki AE, Eisenmann DR. Morphometry and autoradiography of altered rat enamel protein processing due to chronic exposure to fluoride. *Arch Oral Biol.* 1996;41(8-9):739-47.

Zhu L, Uskokovic V, Le T, Denbesten P, Huang Y, Habelitz S, et al. Altered self-assembly and apatite binding of amelogenin induced by N-terminal proline mutation. *Arch Oral Biol.* 2011;56(4):331-6.

Zhu W, Smith JW, Huang CM. Mass spectrometry-based label-free quantitative proteomics. *J Biomed Biotechnol.* 2010;2010:840518.

Zigmond SH. Signal transduction and actin filament organization. *Curr Opin Cell Biol.* 1996;8(1):66-73.

APENDICE A – Resumos apresentados em Congressos referente aos resultados do estudo

[Start](#) | [Browse by Day](#) | [Author Index](#) | [Keyword Index](#)

Enamel and plasma fluoride in genetically distinct mice

Thursday, June 21, 2012: 9 a.m. - 10:15 a.m.

Location: Poster Hall (Convention Center)

Presentation Type: Poster Session

S. CHARONE¹, A.L. LEITE¹, J.G. CARVALHO¹, M.S. FERNANDES¹, T. DELECRODE¹, P.A. BARRETA¹, L.T. GRIZZO¹, S. GROISMAN², G.M. WHITFORD³, and M.A.R. BUZALAF¹, ¹Bauru Dental School, University of São Paulo, Bauru, Brazil, ²Community Dentistry, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil, ³College of Dental Medicine, Georgia Health Sciences University, Augusta, GA

Objective: A/J and 129P3/J mouse strains have different susceptibilities to dental fluorosis due to their genetic backgrounds. This study aimed to determine fluoride (F) concentrations in plasma and incisor enamel of A/J (susceptible to dental fluorosis) and 129P3/J mice (resistant) exposed to 0 or 50-ppm F water for six weeks. **Methods:** Weanling 129P3/J (n=150) and A/J (n=150) mice were obtained and housed in pairs in plastic metabolic cages. The mice of each strain were assigned to two sub-groups based on the F concentrations in the drinking water (0 or 50 ppm added as NaF). At the end of the experimental period, the mice were anesthetized and blood and maxillary incisors were collected for the determination of F. F in plasma was determined with the electrode after overnight hexamethyldisiloxane-facilitated diffusion. F on the enamel surface was removed by immersion in 0.5 M HCl for 15 s (n=10-15). The solution was buffered with TISAB and analyzed with the electrode. Phosphorus in the enamel samples was analyzed colorimetrically and used to calculate the weight of enamel collected. Data were analyzed by 2-way ANOVA and Bonferroni's test (p<0.05). **Results:** Mean ($\pm$ SD) surface enamel fluoride concentrations (μ g/g) were: 471.4 $\pm$ 215.8, 151.7 $\pm$ 58.8, 2711.3 $\pm$ 1019.2 and 1756.9 $\pm$ 921.6 for 129P3/J control, A/J control, 129P3/J treated and A/J treated, respectively. The corresponding values for plasma fluoride concentrations (μ g/mL) were: 0.019 $\pm$ 0.008, 0.023 $\pm$ 0.010, 0.0252 $\pm$ 0.061 and 0.151 $\pm$ 0.043, respectively. Significant differences in enamel and plasma F were observed for both the strains and treatments. The 129P3/J mice had significantly higher plasma and enamel fluoride concentrations when compared with A/J mice in the treated groups. Treated mice had significantly higher plasma and enamel fluoride concentrations when compared with control mice for both strains. **Conclusions:** Despite known resistance to dental fluorosis, 129P3/J mice have significantly higher fluoride concentrations in both plasma and surface enamel.

This abstract is based on research that was funded entirely or partially by an outside source: FAPESP 2009/10589-6

Keywords: Enamel, Fluoride and Fluorosis

See more of: [Enamel Formation and Pathologies](#)

See more of: [Mineralized Tissue](#)

[<< Previous Abstract](#) | [Next Abstract >>](#)

APENDICE B – Resumos apresentados em Congressos referente aos resultados do estudo

[Start](#) | [Browse by Day](#) | [Author Index](#) | [Keyword Index](#)

Proteomic analysis of maturation and secretory-stage enamel of A/J mice

Thursday, March 21, 2013: 2 p.m. - 3:15 p.m.

Location: Hall 4 (Washington State Convention Center)

Presentation Type: Poster Session

S. CHARONE¹, C. PERES-BUZALAF¹, A. L. LEITE¹, J. G. CARVALHO¹, M. S. FERNANDES¹, L. F. ALMEIDA¹, T. DELECRODE¹, P. A.T.M BARRETA¹, T. REGIANI², M.T. LABATE², C.A. LABATE², S. GROISMAN³, and M. A. R. BUZALAF¹, ¹Bauru Dental School, University of São Paulo, Bauru, Brazil, ²Department of Genetics, Max Feffer Laboratory of Genetics Plant, School of Agriculture, University of São Paulo, Piracicaba, Brazil, ³Community Dentistry, School of Dentistry, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

Objective: The key to understanding enamel biomineralization is to learn how secreted enamel proteins initiate, extend, and organize hydroxyapatite crystals. In order that hypotheses can be framed concerning the molecular mechanisms of enamel matrix-mediated biomineralization, it is necessary to identify and characterize the proteins. Therefore, this study aimed to identify and characterize the enamel protein profile from secretory and maturation-stage enamel of A/J mice. **Method:** Enamel Incisors were dissected from A/J mice. Both immature and mature enamel samples were obtained by scraping the secretory-stage and maturation-stage enamel, respectively. Enamel proteome profiles were examined using 2D-PAGE and coomassie brilliant blue staining. Image Master 2D Platinum software was used for analyzing protein spots. The protein spots were excised from the gels, digested and identified by mass spectrometry (MALDI-TOF) and Mascot Daemon and SwissProt databases.

Result: The major secretory-stage enamel constituents were acidic proteins ranging between 37- and 53-kDa. In the maturation-stage, most identified proteins were also acidic, but had a higher molecular weight (ranging between 96- and 115-kDa). Nine proteins identified are not characterized to date. Most of the identified proteins are related to cell processes (34.8%). The others are related to information pathways (17.4%) and structure and organization (8.7%). **Conclusion:** Proteomic analysis was able to identify proteins potentially involved in enamel biomineralization, which might provide new insights into the molecular mechanisms involved in this process.

Student Presenter This abstract is based on research that was funded entirely or partially by an outside source: FAPESP 2009/10589-6

Keywords: Enamel, Mineralization and Proteins

See more of: [Amelogenesis and Enamel 1](#)

See more of: [Mineralized Tissue](#)

APENDICE C – Resumos apresentados em Congressos referente aos resultados do estudo

Proteomics of secretory and maturation-stage enamel of mice with different susceptibility to fluorosis: fluoride effect

Charone S*, Leite AL, Peres-Buzalaf C, Fernandes M, Almeida LF, Zucki F, Groisman S, Whitford G, Everett E, Buzalaf MAR.

^aDepartment of Biological Sciences, Bauru Dental School, University of São Paulo, Bauru, SP, Brazil.

^bCommunity Dentistry, School of Dentistry, Federal University of Rio de Janeiro, RJ, Brazil.
^cDepartment of Oral Biology, Georgia Regents University, Augusta, GA, USA.

^dDepartment of Pediatric Dentistry, School of Dentistry, The Carolina Center for Genome Sciences, University of North Carolina at Chapel Hill, Chapel Hill, North Carolina, United States of America.

A/J and 129P3/J mice strains have different susceptibilities to dental fluorosis but the molecular mechanisms involved in this response are still unknown. Enamel formation is a staged process involving mainly secretory and maturation stages, each associated with changes in protein expression pattern. This pioneer study determined the profile of protein expression in secretory and maturation-stage enamel matrix of both strains and how F affects this process. A/J (susceptible, n=200) and 129P3/J mice (resistant, n=200) were assigned to 2 groups given low-F food and water containing 0 or 50 ppmF for 6 weeks. Blood and maxillary incisors were collected for F and proteomic analyses. Immature and mature enamel samples were obtained by scraping the secretory-stage and maturation-stage enamel, respectively. Enamel proteome profiles were examined using 2D-PAGE and LC-ESI-MS/MS. 129P3/J mice had significantly higher plasma and enamel F concentrations when compared with A/J mice in the treated groups. Reduction in the number of protein spots was observed in the maturing enamel when compared with secretory enamel. Treatment with F increased the number of protein spots. Also 129P3/J mice presented a higher number of protein spots, suggesting that these mice might secrete different proteins to compensate the adverse effects of F and avoid dental fluorosis. In addition, a number of proteins never described in enamel before, as well as some uncharacterized proteins were identified. This will open new insights regarding amelogenesis and how F affects this process.

Financial support: FAPESP (2009/10589-6 and 2008/03489-2).

ANEXO A – Carta de aprovação do Comitê de ética no ensino e pesquisa em animais

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru

Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-901 – C.P. 73
PABX (0XX14)3235-8000 – FAX (0XX14)3223-4679

Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

Fone: (14)3235-8356

e-mail: mferrari@fob.usp.br

CEEPA-Proc. Nº 008/2011

Bauru, 12 de abril de 2011.

Senhora Professora,

O projeto de pesquisa encaminhado a esta Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais, denominado **Análise proteômica da matriz do esmalte de camundongos susceptíveis ou resistentes à fluorose dentária, expostos cronicamente ou não ao flúor na água de beber**, de autoria de Senda Charone e Aline Leite, foi enviado ao relator para avaliação e considerado APROVADO em reunião desta Comissão realizada no dia **11 de abril de 2011**.

Solicitamos que ao final da pesquisa seja enviado, para avaliação desta Comissão, um Relatório com os resultados obtidos para análise ética e emissão de parecer final, o qual poderá ser utilizado para fins de publicação científica.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Gustavo Pompermaier Garlet
Presidente da Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

Profª Drª Marília Afonso Rabelo Buzalaf
Docente do Departamento de Ciências Biológicas