Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru

FLÁVIA ZAIDAN CARDOSO DOS SANTOS

Determinação da composição da película adquirida formada sobre o esmalte humano *in vivo* e da sua modificação após estimulação química e mecânica do fluxo salivar: estudo proteômico

BAURU

2013

FLÁVIA ZAIDAN CARDOSO DOS SANTOS

Determinação da composição da película adquirida formada sobre o esmalte humano *in vivo* e da sua modificação após estimulação química e mecânica do fluxo salivar: estudo proteômico

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru, da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia.
Área de concentração: Estomatologia e Biologia Oral (Biologia Oral)

Orientação: Profa. Dra. Marília Afonso Rabelo Buzalaf

VERSÃO CORRIGIDA

BAURU

2013

Santos, Flávia Zaidan Cardoso

Sa59d Determinação da composição da película
adquirida formada sobre o esmalte humano *in vivo*
e da sua modificação após estimulação química e
mecânica do fluxo salivar/Flávia Zaidan Cardoso
dos Santos. – Bauru 2013.

147p. : il. ; 31cm

Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de
Bauru. Universidade de São Paulo

Orientadora: Profa. Dra. Marília Afonso Rabelo Buzalaf

Nota: A versão original desta dissertação 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 dissertação, por
processos fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura:

Data:

Comitê de Ética da FOB – USP

CAAE 10678312.4.0000.5417

Data: 28/11/2012

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Irineu e Heloísa

Que sempre foram meus maiores exemplos de sucesso, vitória e dedicação. Jamais esquecerei de todo o apoio, incentivo, investimentos e amor que recebi de vocês. Sem isto, não chegaria onde hoje estou. Agradeço acima de tudo os olhares orgulhosos que deitam em mim. Todas as dificuldades que enfrentei durante esta jornada são recompensadas quando em um abraço sinto a felicidade e o orgulho de vocês. Acredito que estejam genuinamente mais felizes que eu com esta conquista, e por isso eu dedico a vocês este trabalho como forma de agradecimento. Amo vocês eternamente.

Ao meu marido Renato

Que me apoiou e confortou nas horas mais difíceis. Obrigada pelo amor, carinho, compreensão e respeito. Seu incentivo foi essencial para o meu esforço e desempenho. Obrigada por estar e ser presente em minha vida. Agradeço também por não medir esforços para me ajudar e acompanhar. Esta vitória também é sua. Te amo e admiro profundamente.

"The important thing is not to stop questioning. Curiosity has its own reason for existing. One cannot help but be in awe when he contemplates the mysteries of eternity, of life, of the marvelous structure of reality. It is enough if one tries merely to comprehend a little of this mystery every day. Never lose a holy curiosity."

Albert Einstein

"No great discovery was ever made without a bold guess."

Isaac Newton

Agradecimentos especiais

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Marília Afonso Rabelo Buzalaf, pela confiança que depositou em mim desde o início. Obrigada por todos os conhecimentos acadêmicos transmitidos, pelos momentos de descontração e principalmente pelo cuidado verdadeiramente materno que sempre teve comigo. O amor e a disposição com os quais exerce sua profissão honestamente me contagiaram e me fizeram alterar completamente a direção da minha carreira. Seu incentivo e apoio conquistaram minha eterna admiração e gratidão. Foi uma grande honra poder trabalhar ao lado da melhor pesquisadora do mundo. Muito obrigada!

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Walter Luiz Siqueira, por me receber em seu laboratório como mais um membro de sua equipe. O tempo que trabalhamos juntos foi essencial para a realização desta pesquisa e também para meu crescimento pessoal e profissional. Admiro muito a dedicação que tem pela sua profissão. E agradeço sinceramente pela paciência, pela imensa ajuda e pelas oportunidades que me concedeu.

*Agradeço os **voluntários** que participaram desta pesquisa. Sem vocês nada disso seria possível. Minha eterna gratidão.*

*A minha **Irmã Fabiana** que em todos os momentos esteve presente para me ajudar e escutar! Minha pequena, minha branquela... Apesar de teimosa e bagunceira, é uma das Mulheres mais fortes e determinadas da nossa família. Obrigada pela colaboração para superar esta etapa em minha vida... Agradeço por você ter sido além de minha irmã, minha amiga! Te admiro e amo muito.*

*A minha **Irmã Fernanda** que mesmo à distância pôde me ajudar com seus conselhos e ideias. Você foi muito importante para que eu chegasse até aqui, inclusive participando da pesquisa como voluntária! Agradeço de coração toda e qualquer ajuda que já me deu. Amo muito você.*

*Aos meus **sobrinhos queridos Maria Luiza, Maria Tereza e Miguel** que na alegria e inocência da criança, sem saberem me motivaram e incentivaram muito para essa conquista. Sem vocês, eu teria escrito este trabalho dez vezes mais rápido... E dez vezes mais triste! O rostinho de vocês me enche de alegria. Eu poderia admirar a beleza de vocês por horas a fio, se vocês fossem quietinhos! Meus anjinhos... Espero que um dia entendam por quê fui uma tia tão brava (porque vocês mereciam!!!). Amo vocês absurdamente, meus nenéns. Vocês trazem vida a esta casa.*

Aos meus queridos avós José Cardoso (in memorian) e Santana, que sempre foram um referencial na minha existência. Obrigada pelo “Cardoso” que sempre me leva adiante!

A toda a minha Família, que simplesmente por se orgulharem de mim, me fizeram sentir capaz de ir além. Obrigada pelo carinho e pelo incentivo. Espero poder ainda dividir com vocês muitas conquistas, não só minhas, é claro. Onde quer que eu esteja, aguardarei ansiosa a visita de todos. Amo vocês.

Aos meus grandes amigos Camila Moraes, Camila Paiz, Emily Baskerville, Farooque Ahmed, Gabriela Bigarella, Juliano Pessan, Kellen Gasque, Laura Nicolliello, Marina Hegg, Rodney Tehrani e Thaís C. Pereira por me incentivarem e animarem mesmo que a distancia. Obrigada pelas risadas, pelos abraços, pelas mensagens de texto, ligações demoradas, e-mails, enfim, obrigada por qualquer forma de contato que mantiveram comigo. A presença de vocês na minha vida foi imprescindível para a conclusão deste trabalho. Com vocês tudo tem mais sentido. Agradeço pela paciência que tiveram comigo durante os momentos de desespero, estresse, nervosismo, impaciência, tristeza, ira, frustração entre outros! Admito não ter sido a melhor companhia durante diversos momentos nestes últimos anos e peço desculpas por isto. Espero representar para cada um de vocês pelo menos um pouco do que representam para mim. Amo vocês todos demais e guardarei para sempre as memórias dos momentos felizes que tivemos juntos. Farooque and Rodney... google it.

*Às colegas de curso e amigas **Melina Bellini e Taísa Delecrode** pelo apoio, auxílio e pelos momentos de descontração no laboratório. Obrigada por toda a ajuda que me ofereceram desde o início. As meninas película! Unidas conseguimos passar por diversos obstáculos. E quantos foram...! Todos superados com muita determinação e trabalho em conjunto. A paciência e disposição que tiveram para me ensinar algumas técnicas necessárias para a realização desta pesquisa são impagáveis. Devo a vocês muitos dos conhecimentos laboratoriais que adquiri! Além de tudo, poder dividir com vocês tantas novas experiências significou muito para mim. Nenhuma delas teria sido tão marcante se não fosse pela companhia de vocês. Trabalhar e conviver com vocês foi incrível. Admiro muito a determinação e a garra que vejo em vocês. Desejo um futuro brilhante e muito sucesso par as duas! Creio que o que não vão faltar serão oportunidades. Obrigada de coração.*

Agradecimentos

Agradeço inicialmente à **FAPESP** por ter me concedido a bolsa de estudos e com isso viabilizado minha dedicação total ao curso de Mestrado.

À **Faculdade de Odontologia de Bauru/ USP**, por meio de seu diretor prof. Dr. José Carlos Pereira, por todas as oportunidades, recursos e apoios oferecidos desde a graduação.

To **The University of Western Ontario** (Schulich School of Medicine and Dentistry), for providing me all the resources necessary to complete the experimental part of this research. I also thank the members of Siqueira Lab for the pleasant coexistence. Special thanks to the most efficient lab mate and technician Cindy Xiao. I would not have been able to perform so many experiments in such a short period of time if it was not for you. I could never thank you enough for everything you have taught me. Xie xie, Yzhi.

À **Vera Lucia**, secretária do departamento de Ciências Biológicas e do curso de pós-graduação em Estomatologia e Biologia Oral, pela ajuda em diversos momentos e constante torcida.

Aos **funcionários da seção de Pós graduação** e da Biblioteca pela atenção e disponibilidade.

RESUMO

Determinação da composição da Película Adquirida formada sobre o esmalte humano *in vivo* e da sua modificação após estimulação química e mecânica do fluxo salivar: estudo proteômico.

Todas as superfícies sólidas expostas na cavidade bucal são cobertas por uma camada proteinácea denominada película adquirida do esmalte. Trata-se de um filme orgânico, livre de bactérias, que recobre os tecidos dentários e é composto basicamente por proteínas. Diversos trabalhos têm se concentrado na caracterização e no impacto protetor da película adquirida formada sobre a superfície do esmalte. Porém tanto para a película adquirida formada sobre o esmalte *in situ* quanto *in vivo*, as considerações sobre o tipo de saliva que contribuiu para sua formação são bastante limitadas, senão inexistentes. Com base nisto, o objetivo deste estudo foi comparar o perfil proteico em películas adquiridas formadas *in vivo* sobre o esmalte humano em condições de repouso, bem como analisar as películas formadas após estimulação salivar mecânica e química, através de espectrometria de massa. Os experimentos foram realizados por três dias consecutivos, seguindo um delineamento cruzado. Em cada dia, os voluntários (n=9) receberam uma meticulosa profilaxia dentária. Em seguida, aguardaram por duas horas para que a película adquirida fosse formada naturalmente sobre o esmalte (saliva não estimulada – Grupo 1, controle). Após o período em questão, cada quadrante da boca foi enxaguado, seco e a película adquirida foi então coletada com auxílio de um papel filtro de eletrodos (*electrode wick filter paper*, Bio-Rad) embebido em ácido cítrico 3%. Os procedimentos descritos acima foram repetidos em outros dois dias consecutivos para cada voluntário, sendo que em um dos dias os voluntários estimularam o fluxo salivar mecanicamente (saliva com estimulação mecânica – Grupo 2), através da mastigação de Parafilm®, durante o mesmo período de tempo. Em outro dia, o fluxo salivar foi estimulado através de gotejamento de ácido cítrico 2% (p/v) em ambas as bordas laterais da língua, em intervalos de 1 minuto, durante o mesmo período de tempo. O restante dos procedimentos foi repetido como descrito. Para cada grupo, foi feito um *pool* com os

papéis de filtro dos 9 voluntários. Após extração e digestão das proteínas presentes nos papéis, foi realizada a separação dos peptídeos por nano-HPLC (nano-Cromatografia Líquida de Alta Performance) interligada a um espectrômetro de massa (LC-ESI-MS/MS). Os dados MS/MS obtidos foram processados e pesquisados junto ao banco de dados de proteínas humanas (UniProt and TrEMBL, Swiss Institute of Bioinformatics) utilizando algoritmo SEQUEST no *software* Proteome Discoverer 1.3 (Thermo Scientific). Foram detectadas no total 115 proteínas/peptídeos identificados por pelo menos dois peptídeos. Todos apareceram em pelo menos três corridas de cada Grupo, sendo que 51 proteínas apareceram nos três grupos. O perfil protéico da película adquirida foi semelhante em todos os grupos, embora tenham sido detectadas proteínas específicas para cada grupo. Utilizando a tecnologia de quantificação SIEVE, foi observado que a concentração de proteínas foi maior nos grupos nos quais houve estimulação salivar (2 e 3). Os resultados sugerem que a estimulação do fluxo salivar, tanto mecânica quanto química, promove a formação de película adquirida com maior concentração de proteínas protetoras como anidrase carbônica, mucinas, cistatinas e imunoglobulinas, o que pode resultar num maior caráter protetor para o esmalte dentário. Contudo, são necessários mais estudos para se compreender por completo o complexo processo de formação (mediante variadas condições) e as dinâmicas funções deste importante tegumento.

Palavras-chave: Película adquirida; esmalte; proteômica; fluxo salivar; proteínas.

Abstract

Characterization of the acquired pellicle formed *in vivo* over human enamel and its modification after mechanical and chemical salivary flow stimulation: proteomic study

All solid surfaces exposed in the oral cavity are covered by a closely adherent protein film termed the acquired enamel pellicle (AEP). It is an organic, bacteria-free film that overlies the hard dental tissues and is basically composed by glycoproteins and proteins. Recently, many studies have focused on the characterization and the protector impact of the acquired pellicle formed over the enamel surface. However either for the *in situ* or *in vivo* formed AEP, information regarding the type of saliva which has contributed for its formation is quite limited, or even inexistent. Based on this, the aim of the present study was to compare the protein profile of acquired pellicles formed *in vivo* over the human enamel surfaces under resting condition and also to analyze the protein profile of the pellicles formed after mechanical and chemical salivary flow stimulation using mass spectrometry. The experiments were performed on three consecutive days, following a crossover design. On each day, the volunteers (n=9) received a meticulous dental prophylaxis and then waited for two hours to allow the AEP formation (non stimulated saliva - group 1). After the time span, each quadrant of the mouth was rinsed with water, dried by air spray and then the collection of the AEP was carried out using a filter paper (electrode wick filter paper, Bio-Rad) presoaked in 3% citric acid. The procedures described above were repeated on two other consecutive days for each volunteer. However, in one day their salivary flow was mechanically stimulated (mechanical stimulation – Group 2) by chewing on Parafilm® during the same period of time. In another day, the salivary flow was chemically stimulated (Chemical stimulation – Group 3) by 2% citric acid drops on each side of the tongue, once per minute, for the same period of time. For each group, a pool with the wick filters from all 9 volunteers was made. After the extraction and digestion of the proteins from the paper strips, peptide

separation and mass spectrometric analyses were carried out with a nano-HPLC Proxeon linked to mass spectrometer (LC-ESI-MS/MS). The obtained MS/MS spectra were searched against human protein databases (UniProt and TrEMBL, Swiss Institute of Bioinformatics) using SEQUEST algorithm in Proteome Discoverer 1.3 software (Thermo Scientific). The combination of all 3 experiments yielded a total of 115 proteins/peptides identified by at least two peptides. All proteins were identified in at least three runs at each Group fifty-one proteins were found in all three Groups. The protein profile of the AEP observed in each study group was similar, but all groups presented specific proteins. Using the SIEVE quantification technology, it was observed that the amount of proteins that compose the AEP was greater in the groups in which the salivary stimulation was performed (2 and 3). The data suggest that salivary flow stimulation, either mechanical or chemical/gustatory, promotes the formation of AEP with higher concentration of protective proteins, such as carbonic anhydrase, mucins, cystatins and immunoglobulins, which may result with a greater protective character for the tooth enamel. However, further studies are necessary to fully understand the complex process of formation (under various conditions) and the dynamic functions of this important integument.

Key words: Acquired pellicle; enamel; proteomics; salivary flow stimulation; proteins.

LISTA DE ABREVIATURAS

AEP	<i>Acquired Enamel Pellicle</i> / Película adquirida do Esmalte
AMP	Adenosina monofosfato
Å	ångström
BCA	<i>Bicinchoninic Acid</i> / Ácido Bicinconínico
Ca	Cálcio
DTT	Ditiotreitol
ESI	<i>Electrospray Ionization</i> / Ionização por eletrospray
<i>g</i>	Força centrífuga em medida da gravidade terrestre
g	gramas
HAP	Hidroxiapatita
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> / Cromatografia Líquida de Alta Performance
IEF	<i>Isoelectric Focusing</i> / Focalização Isoelétrica
IgA	Imunoglobulina A
iTRAQ	<i>Isobaric Tags for Relative and Absolute Quantification</i> / marcador isobárico para quantificação relativa e absoluta
KHN	<i>Knoop Hardness Number</i>
KSP HAP	Produto de solubilidade da hidroxiapatita
kV	Quilovolts
LC	<i>Liquid Chromatography</i> / Cromatografia Líquida

LC/LC	Cromatografia Líquida Bidimensional
LC-ESI-MS/MS	<i>Liquid Chromatography - ElectroSpray Ionization tandem Mass Spectrometry</i> / Cromatografia Líquida Ionização por Eletrospray espectrometria de massas sequencial.
LC - MS/MS	<i>Liquid Chromatography - Tandem Mass Spectrometry</i> Cromatografia Líquida - Espectrometria de Massas Sequencial
M	Molar
MALDI	<i>Matrix-assisted laser desorption ionization</i> / Ionização/ dessorção a laser assistida por matriz
mBCA	<i>Micro Bicinchoninic Acid</i> / Micro Ácido Bicinconínico
Mg	Magnésio
min	Minuto
mL	Mililitros
mm	Milímetros
mM	Milimolar
MS	<i>Mass Spectrometry</i> / Espectrometria de Massas
MudPIT	Multidimensional Protein Identification Technology / Tecnologia Multidimensional para Identificação de Proteínas
m/z	Razão entre massa e carga
Na	Sódio
nL	Nanolitros

nLC - ESI -MS/MS	<i>Nano liquid Chromatography Electrospray Ionization tandem Mass Spectrometry</i> / Nano cromatografia líquida com ionização por eletrospray e espectrometria de massas sequencial
NH_4HCO_3	Bicarbonato de amônio
OH	Hidroxila
PAI _{HAP}	Produto de atividade iônica da hidroxiapatita
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> / Reação em cadeia pela polimerase
pI	Ponto isoelétrico
pIgR	<i>Polymeric Immunoglobulin Receptor</i> / Receptor de Imunoglobulina polimérica
PMMA	<i>Polymethylmethacrylate</i> / Polimetilmetacrilato
PO_4	Fosfato
PRP	<i>Proline Rich Proteins</i> / Proteínas ricas em prolina
p/v	Partes por volume
SAX	<i>Strong-Anion Exchange</i> / Troca Aniônica Forte
SCX	<i>Strong-Cation Exchange</i> / Troca Catiônica Forte
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SDS-PAGE	<i>SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i> / Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida em SDS
SEC	<i>Size-Exclusion Chromatography</i> / Cromatografia por Exclusão Molecular

SILAC	Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell Culture / Análise da Razão de Isótopos Estáveis em Aminoácidos em Cultura de Células
Sr	Estrôncio
TMT	<i>Tandem Mass Tags</i> / marcadores de massa sequenciais
TOF	<i>Time-of-flight</i>
µm	Micrômetro
µL	Microlitros
µg	Microgramas
2D-PAGE	<i>Two Dimensional Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i> / Eletroforese Bidimensional em Gel de Poliacrilamida
2D-DIGE	<i>Difference Gel Electrophoresis</i> / Eletroforese de Fluorescência Diferencial em Gel Bidimensional

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	43
2 REVISÃO DE LITERATURA	49
2.1 ESMALTE DENTÁRIO	49
2.2 SALIVA	51
2.2.1 Considerações gerais sobre a saliva	51
2.2.2 Componentes da saliva	52
2.2.3 Funções e propriedades	54
2.2.4 Formação e secreção salivar	56
2.2.5 O Fluxo salivar	57
2.3 PELÍCULA ADQUIRIDA DO ESMALTE (AEP)	58
2.3.1 Considerações gerais sobre película adquirida	58
2.3.2 Formação e funções da AEP	59
2.4 ANÁLISE PROTEÔMICA	63
2.5 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA PERFORMANCE	64
2.6 ESPECTROMETRIA DE MASSAS	65
2.6.1 Fontes de ionização	66
2.6.1.1 Ionização por dessorção a laser assistida por matriz (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization - MALDI)	67
2.6.1.2 Ionização por spray de elétrons (Electrospray ionization - ESI)	67
2.6.2 Analisadores de massas	69
2.6.2.1 Time-of-Flight (TOF)	69
2.6.2.2 Analisador Quadrupolar (Quadrupole Analyser)	70
2.6.2.3 Armadilhas de íons (Ion Trap - IT)	71
2.6.2.4 Copo de Faraday (Faraday cup)	72

2.6.2.5 Multiplicadores de Elétrons	72
2.6.3 ANÁLISE PROTEÔMICA QUANTITATIVA	73
2.6.3.1 Análise proteômica quantitativa livre de marcadores (Label-free)	76
3 PROPOSIÇÃO	79
4 MATERIAIS E MÉTODOS	83
4.1 Seleção dos Voluntários	85
4.2 Formação e Coleta da AEP	85
4.3 Preparo das amostras	87
4.3.1. Digestão em papel	87
4.4 Cromatografia Líquida tandem Espectrometria de Massas (LTQ-Velos ThermoScientific)	91
4.5 Integração e Quantificação proteômica	92
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	95
6 CONCLUSÕES	125
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	129
ANEXOS	143

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Todas as superfícies dentárias expostas na cavidade oral são cobertas por uma camada proteinácea chamada de película adquirida. Trata-se de um filme orgânico, livre de bactérias, composto por glicoproteínas e proteínas (SIQUEIRA et al., 2007, HANNIG; JOINER 2006). A presença de proteínas recobrindo o esmalte ou a dentina, envolvidas na lubrificação e tendo capacidades tampão e remineralizante, torna a película adquirida um importante fator protetor contra a erosão dentária, que é uma lesão crônica, localizada, caracterizada pela perda de tecido duro devido à exposição a ácidos de origem não bacteriana. Esta proteção contra a erosão dentária ocorre pelo fato de a película adquirida do esmalte (AEP) atuar como uma barreira de difusão ou membrana prevenindo o contato direto entre os ácidos e a superfície dentária, desta maneira reduzindo a dissolução dos tecidos dentários duros (AMAECHI et al. 1999; HANNIG & BALZ 2001; HANNIG et al. 2004; HANNIG; JOINER 2006; HARA et al. 2006; BUZALAF; HANNAS; KATO 2012).

O maior obstáculo em se estudar a composição da película adquirida é o fato de que somente quantidades muito pequenas de película podem ser coletadas. Porém, com a evolução das técnicas de espectrometria de massa, purificação e separação das proteínas atualmente é possível identificar proteínas e peptídeos de variados pesos moleculares e em amostras ínfimas (SIQUEIRA; OPPENHEIM, 2009). Utilizando LC-ESI-MS/MS, um total de 130 proteínas diferentes foi identificado na película adquirida formada *in vivo* no esmalte dentário, sendo que 89 destas puderam ser identificadas em pelo menos 3 experimentos (SIQUEIRA et. al., 2007). Além disso, os autores sugerem que aproximadamente 14% das proteínas identificadas na AEP tem origem nas glândulas salivares. Diversos estudos mostraram que o aumento do fluxo salivar (de cada glândula) sempre será acompanhado de mudanças na composição do fluido formado e secretado. (HEIDENHAIM, 1883; SHANNON, 1958)

Ao longo do dia, a contribuição de cada glândula varia consideravelmente dependendo do estímulo aplicado, o que resulta em mudanças na quantidade e na

composição da saliva (DAWES, 2004). Quando o fluxo é estimulado, a parótida se torna a glândula dominante, contribuindo em cerca de 50% para a saliva total (DAWES, 2004). Pouco se sabe acerca da composição protéica da saliva estimulada quimicamente, uma vez que a grande maioria dos trabalhos utiliza saliva total em condições de repouso. Há relatos de que o tipo de estímulo gustativo é capaz de alterar a expressão protéica na saliva, sendo observado que, na saliva total, o número de proteínas afetadas é maior quando o estímulo é feito com sabor ácido, seguido pelo salgado, umami e finalmente pelo doce (NEYRAUD, et al. 2006). Entretanto, não há relato na literatura acerca da diferença na composição protéica da saliva estimulada mecanicamente.

É esperado que a composição salivar alterada mediante diferentes tipos de estimulação (química ou mecânica) possa afetar também a composição da película adquirida. Sendo assim, fica clara a necessidade de mais estudos para se analisarem possíveis diferenças na composição e estrutura da película adquirida formada sobre o esmalte mediante estimulação mecânica ou química do fluxo salivar.

REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1. ESMALTE DENTÁRIO

O esmalte é uma estrutura mineralizada que recobre a coroa de todos os dentes, protegendo a dentina e a polpa dentária contra estímulos nocivos. É um tecido completamente acelular composto majoritariamente por substâncias inorgânicas (96%) e por uma pequena porção de substâncias orgânicas (4%), o que o torna o mais duro tecido biológico. Apesar disto, este tecido é extremamente friável, ou seja, susceptível a fraturas, especialmente quando o tecido de suporte (dentina) se encontra enfraquecido ou cariado.

Os minerais que compõem o esmalte são do tipo hidroxiapatita $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$, que apresenta cristais com formato hexagonal e bem organizados. Estes minerais são em geral conhecidos como bioapatitas, pois apresentam cristais “defeituosos” e não puros, pois pode haver trocas de íons (Ca substituído por Mg, Sr, Na, etc, que podem modificar a solubilidade e a cristalinidade, embora o formato hexagonal seja preservado. Há ainda no esmalte as fluorapatitas, nas quais ocorre aproximação dos íons de Ca, pois o raio do fluoreto é menor que o da hidroxila, ocupando melhor os espaços e formando uma molécula mais coesa, com redução da sua energia de superfície e maior estabilidade da estrutura do cristal. No esmalte, estes cristais se encontram agrupados em uma conformação denominada “Bastões de esmalte”. Cada um destes bastões é formado por 4 células, os ameloblastos. Os bastões apresentam duas áreas distintas, cabeça e cauda, onde a diferença é a orientação dos cristais. A região da cabeça é formada pelo corpo do ameloblasto e nela os cristais se dispõem paralelamente ao longo eixo do prisma. A cauda possui cristais angulados de 65 a 70 graus com o longo eixo (interbastão). Esta disposição dá aos bastões o formato comumente referido como

“buraco de fechadura”. Entre os cristalitos, ao redor do mineral, dentro dos defeitos do cristalito e na camada de hidratação existe o fluido de esmalte, por meio do qual acontecem as trocas iônicas entre o esmalte e o meio. Ou seja, apesar de ser um tecido extremamente duro, com microdureza superficial de aproximadamente 350 KHN, existem poros que o tornam semipermeável (Estrias de Retzius e Espaços Interprismáticos). A região com menor quantidade de poros (quase inexistentes) é a região aprismática do esmalte, a camada de Darling, que é resultante da deposição de minerais salivares. Como o esmalte é composto basicamente por minerais, seu processo de dissolução é estritamente químico (SELVIG, 1972; LARSEN, 1990; DUCKWORTH, 2005).

Uma das definições químicas universais de “Saturação” é a capacidade máxima de um solvente de dissolver um soluto (MORRISON, et al., 1992). Esta capacidade pode ser alterada pelo pH, ou seja, quando o solvente se encontra com pH baixo, é necessário mais soluto para se atingir a saturação. Na cavidade bucal ocorre o mesmo, ou seja, quando há mais quantidade de soluto (cálcio e fosfato) no ambiente (saliva) que na superfície dentária, ocorre remineralização da estrutura dentária. Quando a quantidade de soluto é menor, ocorre desmineralização.

O Produto de atividade iônica da hidroxiapatita (PAI HAP) indica a quantidade existente de íons livres na solução que circunda o esmalte que está disponível para formar HAP. Este produto é relativamente constante e é determinado pelo cálcio e fosfato na saliva, que é produzida continuamente. Já o produto de solubilidade da hidroxiapatita (KSP HAP), indica a quantidade de íons livre necessários para formar a HAP. Este valor é alterado em função do pH do meio bucal. Portanto, quando o PAI HAP é maior que KSP HAP, a solução está supersaturada e então ocorre formação de apatita (remineralização). Por outro lado, quando o PAI HAP é menor que o KSP HAP, a solução está subsaturada podendo ocorrer desmineralização da superfície dentária, sendo os minerais da esmalte liberados para a saliva (DAWES, 2003b).

O pH crítico para dissolução do esmalte é o pH no qual o produto de atividade iônica se torna igual ao produto de solubilidade. Para a hidroxiapatita, o pH crítico é em torno de 5,5, enquanto que para a fluorapatita, é em torno de 4,5.

É importante ressaltar que, uma vez exposto ao ambiente bucal (erupção), o esmalte é rapidamente recoberto por uma camada proteinácea (LENDENMANN et al., 2000), que é formada sobre sua superfície através da adsorção seletiva de macromoléculas presentes na saliva. Diferentemente da placa bacteriana, este filme possui íntimo contato com as superfícies dentárias, basicamente intermediando as trocas iônicas entre o esmalte e o meio bucal. Sua formação, composição e funções serão discutidas adiante.

2.2 SALIVA

2.2.1 Considerações gerais sobre Saliva

A saliva é um complexo fluido biológico que banha a cavidade bucal e possui diversas e importantes funções na homeostasia bucal. Sua produção depende em grande parte das glândulas salivares maiores (parótidas, submandibulares e sublinguais). Entretanto, a contribuição das glândulas salivares menores (labiais, palatais, linguais, Von Ebner, Ebner, Blandin-Nuhn), do fluido crevicular gengival, células epiteliais descamadas e componentes plasmáticos também é importante para sua formação (EDGAR, 1992; FEJERSKOV, 1994). Além disso, podem existir na saliva componentes não provenientes do hospedeiro, como microorganismos e restos alimentares, que por fim constituem a saliva total.

As glândulas salivares maiores são as principais produtoras de saliva. As parótidas produzem saliva serosa, que tem como principal característica sua consistência aquosa e sua elevada concentração de enzimas (EDGAR, 1992; JENKINS, 1978; FEJERSKOV, 1994). Apesar de ter viscosidade próxima daquela da água, ela ainda apresenta importantes características e qualidades viscoelásticas

(PROCTOR et al. 2005) que permitem a umidificação tanto de superfícies hidrofóbicas quanto hidrofílicas. As glândulas submandibulares e sublinguais se localizam na região do assoalho de boca e desembocam seus ductos também neste local. Sua secreção é mista, isto é, saliva serosa e mucosa, sendo que a porcentagem de produção de cada tipo de saliva pode variar, dependendo da quantidade e do tipo de células que formam as glândulas.

Para a produção de saliva total, a porcentagem de secreção glandular é de aproximadamente 95,6%, a contribuição do fluido gengival crevicular é de 2,4%, de microorganismos 1% e células epiteliais 1% (Figura 1).

Figura 1. Porcentagem de contribuição exócrina e não exócrina para a formação da Saliva Total (WONG, et al., 2008 - modificado)

2.2.2. Componentes da Saliva

Apesar de ser um fluido constituído majoritariamente por água, destacam-se na composição salivar as proteínas. A maioria das proteínas salivares são glicoproteínas, isto é, são proteínas que contêm cadeias de oligossacarídeos (glicanas) covalentemente ligadas às cadeias laterais peptídicas (polipeptídeos) que não se repetem. Os carboidratos podem estar ligados às glicoproteínas em quantidades variáveis e consistem em seu grupo prostético. Algumas das proteínas encontradas na saliva são universais para todas as glândulas salivares, como a transportadora de IgA (principal anticorpo presente na saliva). As mucinas são comuns para as glândulas submandibulares, sublinguais e principalmente para a maioria das glândulas menores, entretanto não são expressas pelas glândulas parótidas e pelas glândulas de Von Ebner (glândulas serosas).

As proteínas básicas ricas em prolina parecem ser exclusivamente produzidas pelas glândulas parótidas, enquanto as proteínas ácidas ricas em prolina aparecem tanto nas parótidas quanto nas submandibulares. As PRPs são conhecidas precursoras da formação da película adquirida (HANNIG; JOINER, 2006). Além das PRPs, outras famílias de proteínas salivares importantes são as cistatinas, mucinas, histatinas, amilases e a estaterinas.

Cistatinas, por sua vez, são proteínas ricas em cisteínas, que apresentam importante atividade inibidora de proteases. Esta característica faz com que as cistatinas amenizem os efeitos deletérios de processos inflamatórios, em função da minimização dos danos aos tecidos associados a proteólise. Altos níveis desta proteínas na saliva podem ser indicativos tanto de ativação de apoptose como do processamento de precursores de citocinas pró-inflamatórias (ROBINSON, 1997).

As mucinas são glicoproteínas de alto peso molecular, ricas em prolina, altamente glicosiladas, com estrutura alongada. A maioria das mucinas contribui significativamente para o comportamento viscoelástico da saliva (a MUC 5B não apresenta este comportamento). Elas podem se autoagregar formando grandes estruturas que tornam então a saliva total (submandibular ou sublingual) viscosa.

As histatinas são proteínas precursoras para a formação da película adquirida (HANNIG; JOINER, 2006) ricas em histidinas. Foi relatado que as histatinas têm se mostrado efetivas no controle de crescimento fúngico na cavidade bucal (HELMERHORST et al. 1999). Além disso, as histatinas exibem em geral atividade

antifúngica em *C. albicans* (fase planctônica) (GYURKO et al., 2000; PUSATERI et al., 2009) e em biofilmes contendo *C. albicans* (KONOPKA et al., 2010). Mais recentemente, Vukosavljevic et al. (2012) relataram a atividade antifúngica da H5 contra o crescimento da *C. albicans* sobre diferentes substratos (hidroxiapatita e PMMA) em diferentes tempos *in vitro*.

As amilases salivares são proteínas glicosiladas em sua maioria que apresentam diversas isoformas, sendo que 6 destas isoenzimas já foram descritas (EDGAR, 1992; JENKINS 1978; NIKIFORUK, 1985). São as proteínas mais abundantes na saliva e a maioria atua ativamente na digestão da maltose, podendo também atuar em polissacarídeos. Uma possível explicação para o fato de estas serem as proteínas mais abundantes na saliva é a sua importante participação no *clearance* bucal após a mastigação.

A estaterina é uma fosfoproteína que parece ser importantíssima para a saliva em termos de propriedades físicas. Seu nome deriva do grego “*Statheropio*”, que significa estabilizar. Esta proteína pode se ligar a íons Ca^{+2} presentes na saliva, balanceando os processos de remineralização e deposição cálcica nas superfícies dentárias. É rica em tirosina, prolina e em ácido glutâmico, e possui baixo peso molecular (BENNICK, 1975). É uma proteína salivar com cargas negativas que contém resíduos de fosfoserina proporcionais nas posições 2 e 3. É a única proteína salivar que inibe tanto a precipitação primária/inicial de fosfato de cálcio (precipitação espontânea) quanto a precipitação secundária de fosfato de cálcio (Crescimento de cristais), funções cruciais relacionadas com o controle da formação de cálculos dentários e a remineralização de lesões de cárie iniciais (OPPENHEIM et al., 2007). Além disso, foi demonstrado que a estaterina facilita a ligação de *Actinomyces viscosus* (CLARK et al., 1986) e *Fusobacterium nucleatum* (XIE et al., 1991) à superfície de HAP, indicando que esta proteína é determinante na colonização bacteriana inicial da superfície dentária.

2.2.3. Funções e propriedades

As funções da saliva são essenciais para a manutenção da saúde e homeostasia bucal. Na ausência de saliva, tanto os dentes quanto a mucosa bucal se tornam muito mais vulneráveis a infecções bacterianas, virais e fúngicas. Pacientes com xerostomia crônica (hipossalivação) são muito mais susceptíveis a desenvolver lesões cariosas, infecções orais e desgastes dentários combinados (erosão, abrasão e atrição). Ou seja, a saliva protege os tecidos bucais de diversas maneiras. Apesar de ser composta majoritariamente por água (99%), os componentes iônicos e proteicos (1%) tornam a saliva um fluido viscoelástico, capaz de executar diversas funções (DAWES, 2004).

Como exemplo, pode-se citar a limpeza que o fluxo salivar contínuo promove na cavidade bucal, fazendo com que a maior parte dos restos alimentares seja ingerida. Os íons que a saliva possui (particularmente bicarbonatos e fosfatos) atuam no tamponamento do ambiente bucal, protegendo as estruturas dentárias contra desmineralização e atuando também no processo de remineralização dentária. Devido às suas propriedades lubrificantes, a saliva promove umidificação do bolo alimentar, auxilia no paladar e diminui o atrito dente-dente e entre as mucosas. As amilases e lipases presentes na saliva iniciam o processo de digestão do amido e gorduras, respectivamente.

Outra importante característica é a presença de proteínas específicas (Imunoglobulinas, mucinas, histatinas e cistatinas) que conferem à saliva propriedades antibacterianas, antivirais e antifúngicas. Em adição, a saliva coadjuva na formação de um filme protéico sobre a superfície dos dentes que previne o contato direto de ácidos (endógenos ou exógenos) com a estrutura dentária, representando determinada proteção contra a desmineralização (DARLING, 1956; JUURIAANSE, 1979).

Todas estas funções estão diretamente relacionadas com as inúmeras proteínas encontradas neste fluido oral. Vale ressaltar que a secreção de cada glândula tem características protéicas distintas. Por exemplo, a glândula sublingual produz saliva rica em mucinas e pobre em amilase salivar, enquanto a glândula

parótida que é a maior fonte de amilase salivar e proteínas ricas em prolina e quase não contêm mucina. Isto é, dependendo da porcentagem de secreção de cada par de glândulas, a saliva total exibirá diferentes características e funções.

2.2.4 Formação e Secreção salivar

A secreção da saliva é um mecanismo largamente estudado que envolve a secreção ativa de sais (íons sódio e cloro) pelos ácinos glandulares para dentro do lúmen do ducto da glândula, através do recebimento de sinais nervosos que atuam nos receptores muscarínicos das células acinares. A água derivada do sistema sanguíneo (sem proteínas) passa pelas apertadas junções celulares das paredes dos vasos e, através de canais chamados “canais de aquaporina”, entra nas células acinares para formar a saliva (isotônica em relação ao soro) (DAWES, 2004; CARPENTER, 2012).

Ocorre em seguida a recaptação de sais, o que torna a saliva isotônica primária em saliva hipotônica. Este evento tem importantes implicações para a manutenção das papilas gustativas e sua sensibilidade à detecção de sal (MATSUO, 2000). A saliva sendo hipotônica permite que as papilas gustativas detectem a presença de sal em uma concentração muito menor que aquela encontrada no soro sanguíneo, e esta é a razão pela qual lágrimas, suor e sangue têm sabor salgado. Fica claro que a formação deste fluido não ocorre por pressão de filtração, mas sim por transporte ativo de solutos pelo tecido glandular e de um aumento significativo no *turnover* metabólico sob estimulação (FEJERSKOV & KIDD, 2005)

As glândulas salivares são densamente innervadas pelos sistemas nervosos simpático e parassimpático. Ao contrário do resto do corpo, nas glândulas salivares estes dois sistemas atuam em conjunto e não antagonicamente. Geralmente, os impulsos nervosos parassimpáticos produzem saliva em maior fluxo, porém com menor concentração protéica. Já os impulsos nervosos simpáticos produzem saliva

em menor fluxo, com alta concentração de proteínas. Porém, isto não ocorre em absoluto. O estímulo parassimpático parece ser importante para a secreção de mucinas, e o estímulo adrenérgico pode provocar certo fluxo salivar (PROCTOR, 1998).

Como já dito, a secreção de sais no lúmen ocorre mediante estimulação dos receptores muscarínicos dos ácinos através do cálcio intracelular. Em contraste, a secreção de proteínas para a saliva é geralmente mediada por estímulos nervosos simpáticos dos receptores beta (e em certa extensão dos receptores alfa) adrenérgicos que agem por meio de mudanças no AMP (adenosina monofosfato) cíclico intracelular, que causam a fusão dos grânulos de secreção com a membrana apical da própria célula acinar (CASTLE & CASTLE, 1998). Entretanto, nem todas as proteínas são secretadas desta maneira. Um notório exemplo é a IgA (imunoglobulina A), um dos mais importantes anticorpos salivares, que não provém de estoque intracelular e é secretada através de uma proteína transportadora denominada Receptor de Imunoglobulina polimérica (em inglês "Polymeric Immunoglobulin Receptor - pIgR). A IgA é sintetizada por células plasmáticas presentes nas glândulas salivares e se liga à pIgR das células ductais e acinares da superfície basolateral. Uma vez endocitada pela célula, permanece dentro de uma vesícula que é transportada desde o citoplasma da célula até a membrana apical, onde o receptor é clivado para liberar a IgA (MEGA, et al., 1992).

2.2.5 O fluxo salivar

A contribuição diária de saliva por cada glândula pode variar consideravelmente, dependendo do estímulo aplicado e do ciclo circadiano, o que resulta em mudanças na quantidade de secreção salivar e em sua composição. Quando o fluxo é estimulado, a parótida se torna a glândula dominante, contribuindo em cerca de 50% a 60% para a saliva total (DAWES, 2004; WONG, 2008). Ao se

estimular o fluxo salivar quimicamente (estimulação gustatória) com ácido cítrico, o fluxo gerado é, sem dúvidas, o maior possível. Com apenas um décimo da concentração dos outros estimulantes estudados (doce, salgado, amargo e umami), pode-se obter estimulação equivalente do fluxo salivar com o estimulante azedo/ácido (HODSON & LINDEN, 2006).

Segundo Fejerskov & Kidd (2005), a composição salivar varia de acordo com a natureza do estímulo (gustativo ou mecânico) e com sua duração. Como já dito, é relatado na literatura que diferentes tipos de estímulos gustativos são capazes de alterar a composição e a expressão protéica na saliva, porém o processo aparenta não ter relação com nenhum tecido ou glândula de origem específica (STIEGER, 2012). Em um estudo recente, foi observado, utilizando ferramentas proteômicas, que na saliva total o número de proteínas afetadas é maior quando o estímulo é feito com sabor ácido, seguido pelo amargo, umami e finalmente pelo doce (NEYRAUD, 2006). Existem na literatura poucas comparações entre os perfis protéicos de salivas estimuladas quimicamente, mecanicamente e não estimulada (repouso).

2.3 PELÍCULA ADQUIRIDA DO ESMALTE (AEP)

2.3.1. Considerações gerais sobre película adquirida

As superfícies dentárias são normalmente cobertas por um filme proteico justamente aderido denominado AEP. Trata-se de um fino filme acelular que se forma sobre as superfícies dentárias mediante exposição ao ambiente bucal (SIQUEIRA, 2012b). Esta estrutura possui 3 principais funções conhecidas no ambiente bucal: retarda a desmineralização do esmalte (DARLING, 1956;

JUURIAANSE, 1979), previne o crescimento de cristais provenientes da saliva supersaturada na superfície do esmalte (HAY et al., 1975; MORENO et al., 1979) e afeta a aderência de microrganismos à superfície dentária (VUKOSAVLJEVIC, 2012).

Sua formação parece envolver a adsorção seletiva de macromoléculas salivares sobre os tecidos dentários (MAYHALL, 1970; SONJU e ROLLA, 1973; SIQUEIRA et al., 2012b) e é composta basicamente por proteínas, incluindo várias enzimas (HANNIG et al. 2005b). No entanto, além de proteínas salivares, a AEP possui proteínas de outras origens (celulares, sanguíneas, etc), carboidratos e lipídeos (SIQUEIRA et al., 2012b).

O conhecimento da composição protéica da saliva e da película adquirida teve grande expansão nos últimos anos devido ao surgimento de técnicas de análise proteômica para separação e identificação (GHAFOURI et al. 2003; YAO, et al. 2003; NEYRAUD, 2006; SIQUEIRA et al. 2007; SIQUEIRA et al. 2009; SIQUEIRA et al. 2011; ZIMMERMAN et al. 2012).

2.3.2 Formação e funções da AEP

A formação da AEP é um processo altamente seletivo e dinâmico que é influenciado por diversos fatores, como o ciclo circadiano, microbiota oral, capacidade proteolítica do ambiente e as propriedades químicas e físicas da superfície dentária. O início de sua formação é engatilhado dentro de segundos de exposição à saliva total e sua espessura aumenta gradativamente até atingir de 10 a 20 nanômetros, ficando estável por aproximadamente 30 minutos (LENDENMANN et al., 2000).

Proteínas salivares com alta afinidade pela hidroxiapatita são comumente referidas como “precursoras da película” e geralmente iniciam o processo através de

interações eletrostáticas com o esmalte (HAY, 1973). As proteínas precursoras da película incluem a estaterina (HAY, 1973), as PRPs (OPPENHEIM et al., 1971), cistatinas (LAMKIN et al., 1991) e as histatinas (HAY, 1975; OPPENHEIM et al., 1986).

Após o primeiro incremento (camada), ocorre um rápido aumento de espessura, atribuído à adsorção de agregados de proteínas salivares à película jovem por meio de interações proteína-proteína. A espessura da película atinge um *plateau*, entre os 30 e 90 minutos de formação, que pode ter de 100 a 1000 nm (SKJORLAND et al., 1995) dependendo da localização na boca (HANNIG; BALZ 1999). Além da localização na cavidade bucal, outros fatores como o uso regular de dentífrícios abrasivos, produtos de branqueamento dentário ou ingestão de alimentos e bebidas ácidas podem afetar a formação e maturação da película adquirida. A formação da película adquirida é um processo altamente seletivo, uma vez que aproximadamente 130 proteínas humanas (de um total de 2290) compõem este tegumento (SIQUEIRA et al., 2007; SIQUEIRA; DAWES, 2011).

Em consequência da sua íntima relação com o esmalte, a AEP desempenha um papel importante na manutenção da integridade das estruturas dentárias, controlando a dinâmica da solubilidade mineral do esmalte. Em sua interface com o meio bucal, a película exerce uma seletividade na agregação bacteriana estando, portanto, envolvida nos estágios iniciais da formação do biofilme. Recentemente, vários estudos têm se concentrado no estudo do impacto protetor da película adquirida formada *in situ* sobre a superfície do esmalte (HANNIG; BALZ, 1999; HANNIG; BALZ, 2001; HANNIG, 2003; HANNIG, 2004). Uma vez que diferentes ácidos demonstraram diferentes capacidades de desmineralização do esmalte bovino (HANNIG et al., 2005a), a proteção da película formada *in situ* na erosão do esmalte e da dentina causada pelos ácidos hidrolórico, cítrico e fosfórico foi analisada (WIEGAND, et al. 2008). Neste estudo, espécimes de esmalte e dentina bovinos foram expostos por 120 minutos na cavidade bucal de 10 voluntários saudáveis para que houvesse a formação de película adquirida consideravelmente espessa e sem agregação bacteriana. Na sequência, com a AEP formada sobre os espécimes de esmalte e dentina, os mesmos foram imersos extraoralmente em 1 mL de ácido hidrolórico, cítrico ou fosfórico (pH 2,6, 60 segundos, n=30 para cada ácido). Espécimes sem formação prévia de película adquirida (n=10) serviram como

grupo controle. A liberação de cálcio nas soluções ácidas foi determinada por espectrometria de absorção atômica. Os espécimes recobertos pela película tiveram perda de cálcio significativamente reduzida quando comparados àqueles sem película, para todos os tipos de ácidos. A proteção média ($\pm$ DP) conferida pela película (porcentagem de redução de perda de cálcio) foi significativamente melhor para o esmalte ($60,9 \pm 5,3$) que para a dentina ($30,5 \pm 5,0$), entretanto não houve diferença entre os tipos de ácidos. Achados semelhantes foram obtidos em outros estudos. Foi observada uma redução na perda de cálcio entre 60 e 78% para amostras de esmalte erodidas por ácidos cítrico a 1% por 60 segundos (HANNIG et al. 2003; HANNIG et al., 2004). A proteção média (30,5%) obtida para a dentina combinando os resultados dos três diferentes tipos de ácidos no estudo de Wiegand et al. (2008) está de acordo com resultado de um estudo prévio (HANNIG, et al., 2007), que encontrou uma redução da perda de cálcio da ordem de 27% após o tratamento com ácido hidrolórico (pH 2,3, 5 minutos). Outro estudo *in vitro* também mostrou que a película ofereceu proteção significativamente maior para o esmalte (44%) que para a dentina (14%) (WETTON, et al. 2006).

A combinação de diversas técnicas incluindo imunogênica, histológica, cromatográfica e eletroforética levaram à identificação de amilase, imunoglobulinas, aglutinina, PRPs, histatina 1, anidrase carbonica, lactoferrina, lisozima e cistatinas na AEP formada *in vivo*. Com o início da era proteômica e o desenvolvimento e aplicação de técnicas cada vez mais sensíveis (detecção em nível de picomoles) houve uma rápida expansão no conhecimento sobre a composição da película formada *in vivo*. Estas técnicas incluem LC-ESI-MS/MS e MALDI-TOF-MS, que têm facilitado uma compreensão mais direta sobre a caracterização dos componentes da AEP do que as técnicas antes utilizadas, envolvendo ensaios enzimáticos ou imunogênicos (SIQUEIRA, et al., 2007)

Avanços nas técnicas de análise proteômica tornaram possível a identificação e caracterização dos componentes da AEP, apesar das pequenas quantidades de amostras. Em consequência disto, trabalhos recentes têm caracterizado a película adquirida *in vivo*, suas modificações perante a presença de fluoretos, seus componentes de baixo peso molecular (SIQUEIRA et. al., 2007; SIQUEIRA et. al., 2009; SIQUEIRA et. al., 2011; SIQUEIRA et. al., 2012; SIQUEIRA et. al., 2013; MASSON et al., 2013) entre outros.

Em um estudo utilizando LC-ESI-MS/MS, um total de 130 proteínas diferentes foi identificado na película adquirida formada *in vivo* no esmalte dentário, sendo que 89 destas puderam ser identificadas em pelo menos 3 experimentos (SIQUEIRA, et al., 2007). Entre as proteínas identificadas, somente 14,4% eram originárias das glândulas salivares exócrinas, enquanto 67,8% eram derivadas de células e 17,8% do soro sanguíneo, vindo por meio do fluido gengival. Se estas proteínas forem agrupadas com base no seu possível papel na formação da película adquirida, as mesmas podem ser separadas em três grandes grupos: proteínas que têm habilidade de se ligarem a íons cálcio (17,5%), aquelas que mostram uma alta tendência de se ligarem a íons fosfato (15,4%), as quais devem formar a primeira camada de proteínas que se adsorvem à superfície do esmalte e, finalmente, aquelas que são capazes de interagir com outras proteínas (28,2%). As últimas estão provavelmente envolvidas na formação de camadas proteicas sucessivas (e *clusters*) por interagirem com outras proteínas diretamente adsorvidas à superfície do esmalte. Em relação à sua função biológica, as proteínas identificadas estão envolvidas na resposta inflamatória (12,5%), na defesa antimicrobiana (8,3%) ou na resposta imune (11,3%), na lubrificação (<1%), e capacidades tampão (<1%) e remineralizante (15,5%).

Apesar de os resultados mostrarem que somente 14,4% das proteínas identificadas eram provenientes das glândulas salivares sabe-se que a quantidade e composição da saliva são afetadas pelo tipo de estímulo (HODSON & LINDEN, 2006; NEYRAUD et al., 2006). Ademais, não há na literatura comparações entre películas formadas mediante estímulo salivar e em repouso. São necessários portanto mais estudos para se analisarem possíveis diferenças na composição e estrutura da película adquirida formada sobre o esmalte quando a saliva é estimulada mecânica ou quimicamente.

Obter conhecimentos profundos e detalhados sobre as funções e composição da AEP poderá representar um passo inicial para que no futuro se possa pensar em procedimentos envolvendo “engenharia de película”, isto é, estimular a formação de uma película adquirida mais apropriada para a modulação da desmineralização dentária e da agregação bacteriana

2.4 ANÁLISE PROTEÔMICA

A automação dos métodos de análises dos ácidos nucléicos, tais como PCR e *microarrays*, culminou no sucesso de vários projetos genômicos na década de 90. Isto permitiu que a genômica fosse estudada em larga escala, tanto em organismos procariontes como eucariontes (WILKINS et al., 1997).

O término do sequenciamento de nucleotídeos dos genomas de uma variedade de organismos, inclusive o genoma humano, foi uma conquista incrível da biologia molecular. No entanto, estas informações não forneceram descrições sobre os processos dinâmicos que ocorrem nas células (e organismos), pois embora os padrões comportamentais das células reflitam a informação estocada no genoma, são as proteínas que desempenham papéis fundamentais nos sistemas biológicos, como por exemplo, sendo responsáveis pelo fenótipo definitivo da célula. Suas atividades específicas, associação com outras biomoléculas, estado de modificação e os níveis de expressão são essenciais para a descrição dos sistemas biológicos. Sendo assim, torna-se impossível elucidar os diversos mecanismos que interagem em um determinado organismo apenas pelo estudo dos genes.

Em virtude disto, surgiu uma nova abordagem experimental conhecida como análise proteômica, que consiste em um conjunto de ferramentas empregadas para caracterizar (qualitativa e quantitativamente) um conjunto de proteínas expressas por um dado genoma, e este conjunto de proteínas foi chamado de PROTEOMA (WILKINS et al., 1997). Ao contrário do 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 exons, 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 (WILKINS et al., 1997).

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).

2.5 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA PERFORMANCE

A maioria das proteínas, na sua forma íntegra, é muito grande para ser corretamente identificada pela espectrometria de massa e por isto necessitam ser submetidas 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 et al. 1993; THIEDE et al., 2005).

O termo Cromatografia Líquida de Alta Performance, do inglês “High Performance Liquid Chromatography”, é uma técnica cromatográfica de separação de compostos de uma mistura que tem o propósito de identificar, quantificar ou purificar componentes individuais. A técnica possui variadas utilidades que incluem uso industrial, médico, legal e em pesquisas científicas.

De acordo com Lindsay & Kealey (1987), a cromatografia pode ser descrita como um processo de transferência de massas que envolve adsorção. A técnica HPLC depende de bombas para transferir líquido e a amostra (mistura) através de uma coluna preenchida com um solvente, o que leva à separação dos componentes. O componente ativo da coluna, o adsorvente, é tipicamente um material granular feito de partículas sólidas (tais como sílica e polímeros) que podem ter de 2 a 50 micrometros. Para as colunas de HPLC, as partículas de adsorvente são geralmente feitas com 2 a 5 micrômetros em média, o que dá à técnica um poder de resolução maior. A separação dos componentes da amostra ocorre devido aos seus diferentes graus de interação com as partículas do adsorvente. O líquido pressurizado geralmente é composto de uma mistura de solventes (como água, acetonitrila e/ou metanol) e é referido como “fase móvel”. Sua composição e temperatura têm papel importantíssimo no processo de separação, em função de influenciarem diretamente nas interações entre a amostra e o adsorvente. Estas interações são de natureza física, como hidrofobicidade, dipolo-dipolo e iônica, porém são majoritariamente a combinação destas. Em resumo, um instrumento de HPLC tipicamente inclui um amostrador (onde as amostras são colocadas), bombas e um detector. O amostrador faz com que a amostra entre na fase móvel, as bombas controlam o fluxo e porcentagem de solventes desejados na fase móvel (através da coluna) e o detector gera um sinal proporcional à quantidade dos componentes da amostra que emergem da coluna. Alguns modelos de bombas mecânicas de HPLC podem misturar múltiplos solventes em proporções que modificam conforme o tempo decorrido, criando um gradiente na fase móvel (LINDSAY; KEALEY, 1987)

2.6 ESPECTROMETRIA DE MASSAS (MASS SPECTROMETRY - MS)

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. O equipamento é basicamente dividido em três partes: uma fonte de ionização, um analisador e um detector, sendo que a molécula a ser analisada percorre obrigatoriamente este caminho, nesta ordem.

2.6.1 FONTES DE IONIZAÇÃO

A ionização é o processo capaz de converter um átomo ou molécula em um íon. Na fonte de ionização, os componentes da amostra são convertidos em íons, ou por bombardeio da amostra com elétrons, íons, moléculas ou fótons, ou pelo uso de energia térmica ou elétrica. Existem diversos tipos de ionizadores, dentre os quais podemos citar: a ionização eletrônica (EI - Electron Ionization), ionização química (CI - Chemical Ionization), ionização por bombardeamento rápido de átomos (FAB - Fast Atom Bombardment), ionização química à pressão atmosférica (APCI - Atmospheric Chemical Pressure Ionization), ionização por dessorção de spray de elétrons (DESI - Desorption Electrospray Ionization), ionização de campo (FI - Field Ionization), dessorção de campo (FD - Field Desorption), dessorção por plasma (PD - Plasma Desorption), *thermospray*, *photospray* e análise direta em tempo real (DART - Direct Analysis in Real Time) (DASS, 2007; HOFFMANN; STROOBANT, 2007). No entanto, para análise de proteínas e peptídeos, as técnicas de ionização mais comumente utilizadas são ionização por *spray* de elétrons (electrospray ionization - ESI) e ionização por dessorção a laser assistida por matriz (matrix-assisted laser desorption ionization - MALDI), que serão brevemente descritas abaixo.

2.6.1.1 Ionização por dessorção a laser assistida por matriz (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization - MALDI)

A técnica MALDI foi descrita por Karas e colaboradores, em 1987 (KARAS et al., 1987). O princípio da técnica baseia-se em misturar a amostra com um solvente contendo um material com capacidade de absorver luz no comprimento de onda do laser, conhecido como matriz (ácido 2,5-dihidroxibenzóico ou ácido α -cyano-4-hidroxicinâmico). Inicialmente é feita a aplicação da amostra juntamente com a matriz e, em seguida, a mesma é atingida por um feixe de laser. A matriz é capaz de absorver a energia do laser e transferir para a molécula de interesse, resultando na evaporação e ionização de ambos. Este processo ocorre em uma câmara, sob vácuo, e os íons formados na fase gasosa são acelerados por campos eletrostáticos em direção ao analisador de massas, que na maioria das vezes é do tipo TOF (DASS 2007; HOFFMANN; STROOBANT 2007).

2.6.1.2 Ionização por spray de elétrons (Electrospray ionization - ESI)

A ESI é uma das principais técnicas de ionização em pressão atmosférica e também uma das mais importantes na determinação estrutural de diversas moléculas biológicas. Os primeiros relatos envolvendo *eletrospray* são de 1917, descritos por Zeleny (ZALENY, 1917), porém foi somente no fim dos anos 80 que Fenn e colaboradores utilizaram uma descarga elétrica na ionização de biomoléculas, sendo então laureados com o prêmio Nobel de Química, em 2002.

Na ESI, todo o processo de ionização ocorre à pressão e temperatura atmosféricas. Uma solução volátil levemente ácida contendo a amostra é bombeada a uma vazão

de alguns microlitros por minuto através de um tubo capilar metálico, no qual é aplicada uma voltagem (3 a 4 kV). Nesse momento, inicia a formação do cone de Taylor na ponta do capilar. Esse procedimento gera um spray contendo gotículas (<10 µm de diâmetro) de molécula e solvente altamente carregadas. As gotículas são evaporadas tendo seu diâmetro rapidamente reduzido, fazendo com que as cargas ali presentes fiquem mais próximas e conseqüentemente ocorra uma maior repulsão entre elas. Quando essa repulsão for maior que a tensão do solvente, as gotículas explodem formando microgotas ainda menores, processo esse denominado fissão Coulômbica, pois ocorre por forças de repulsão Coulômbicas (eletrostáticas). A partir deste ponto, têm sido propostos dois mecanismos para explicar a dessorção dos íons a partir das microgotas: o modelo do resíduo carregado (CRM – charged-residue model) e o modelo da dessorção de íons (IDM – ion-desorption model) (DASS 2007; HOFFMANN; STROOBANT 2007).

O modelo CRM propõe que a sequência evaporação de solvente e fissão Coulômbica é repetida várias vezes até que o tamanho da gota seja tão reduzido que conterá somente o analito. Por fim, com a evaporação do solvente, a molécula é dispersa no ambiente gasoso, retendo a carga da gota. Já o modelo IDM considera que, com a evaporação, as gotículas de solvente chegam a um determinado raio (~20 nm) em que a densidade elétrica na sua superfície é grande o suficiente para expulsar os analitos diretamente para fora da gotícula. Neste momento, ocorreria a transferência de carga entre o solvente e o analito (DASS 2007; HOFFMANN; STROOBANT 2007). Existe ainda muita discussão quanto ao mecanismo exato de transferência de cargas entre o solvente e o analito, mas acredita-se que ambos os mecanismos ocorram de acordo com o tipo de analito. Assim, o modelo CRM aconteceria quando o analito é composto por moléculas hidrofílicas, enquanto que o IDM se aplicaria melhor para moléculas hidrofóbicas. Os íons são subseqüentemente submetidos a alto vácuo e acelerados através de um campo elétrico para o analisador de massas do espectrômetro.

Vale destacar que compostos como sais e detergentes interferem diretamente na análise por ESI, uma vez que causam supressão dos íons formados ou uma determinação ambígua das massas quando combinados com o analito. Por isso,

aconselha-se a combinação com técnicas de separação e purificação, como, por exemplo, a cromatografia líquida para obtenção de melhores resultados.

2.6.2 Analisadores de massas

A fonte de ionização é a parte do espectrômetro de massas que produz os íons a partir dos analitos. A base da espectrometria de massas é a separação destes íons por suas diferenças de m/z . Para atender a esta necessidade, foram desenvolvidas diferentes formas para controlar a trajetória desses íons através do espectrômetro, que são realizadas por campos elétricos e magnéticos, chamados de analisadores de massas. Abaixo, será feita uma breve apresentação dos principais analisadores utilizados para separação dos íons na análise proteômica.

2.6.2.1 Time-of-Flight (TOF)

Os analisadores do tipo Time-of-Flight (TOF) são os mais empregados em associação com MALDI e, por princípio, são os analisadores de massa mais simples. Consistem essencialmente em um tubo de vôo mantido sob vácuo onde, após desorvidos da matriz, os íons são acelerados em um campo altamente elétrico (≈ 20 kV) com energias cinéticas iguais e voam ao longo do tubo com velocidades diferentes, que são inversamente proporcionais às suas massas. Assim, os íons com massas menores chegam ao detector mais rapidamente que os com massas maiores (DASS, 2007). Outra característica importante é que, para o funcionamento

do TOF, é imprescindível que todos os íons formados na fonte entrem no analisador ao mesmo tempo, pois só assim será possível determinar o tempo que cada íon levou para percorrer toda a extensão do analisador.

Para aumentar a resolução dos analisadores do tipo TOF, dois avanços tecnológicos foram implementados: a extração atrasada de íons (*delay extraction*) e o modo de operação com refletor (*reflectron*). O primeiro é específico para situações nas quais a ionização por MALDI é empregada e consiste única e exclusivamente em introduzir um tempo de atraso entre o momento da ionização e a aplicação do potencial de extração. No segundo, uma série de eletrodos espaçados é introduzida no final do tubo de voo linear, aumentando o tamanho do tubo de voo, e consequentemente o caminho a ser percorrido pelos íons será maior (DASS, 2007).

2.6.2.2 Analisador Quadrupolar (Quadrupole Analyser).

Um analisador de massas quadrupolar ideal é composto por um conjunto de quatro barras metálicas paralelas (eletrodos) mantidas a potenciais elétricos, sendo de mesmo sinal o potencial das barras opostas e contrário o das barras adjacentes. Tais barras estabilizam ou desestabilizam os íons seletivamente, de acordo com seus valores de m/z , durante sua passagem pelo centro do quadrupolo (DASS, 2007; HOFFMANN; STROOBANT, 2007).

O campo elétrico oscilante é gerado nos eletrodos pela aplicação de potenciais de corrente-direta (DC – *direct-current*) e rádio-frequência (RF). Através de variações sistemáticas nos valores de DC e RF, a trajetória dos íons é estabilizada ou desestabilizada, sendo que o quadrupolo funciona como um filtro. Isso permite que os íons de diferentes valores de m/z cheguem com tempos diferentes ao detector, e desta forma podem ser diferenciados. Este mesmo princípio pode ser utilizado para estabilizar a trajetória de apenas um íon desejado, que pode

ser posteriormente fragmentado, como será visto posteriormente (DASS, 2007; HOFFMANN; STROOBANT, 2007).

2.6.2.3 Armadilhas de íons (Ion Trap - IT)

Os analisadores do tipo IT operam por princípios físicos semelhantes aos do quadrupolares. Porém, ao invés de os íons realizarem a trajetória através do ambiente quadrupolar, eles são aprisionados dentro deles durante todo o tempo necessário para executar as operações habituais em MS, daí o nome “armadilha de íons”.

Os íons transferidos para o analisador são aprisionados por meio da ação de três eletrodos hiperbólicos (um eletrodo tipo *ring* e dois do tipo *endcap*), que permitem a criação de um campo elétrico quadrupolar tridimensional que, por sua vez, mantém os íons em uma órbita estável no seu interior (DASS, 2007). Ao contrário do 3D-IT, o IT linear apresenta quatro barras hiperbólicas as quais fazem com que os íons sejam aprisionados numa posição axial ao longo das barras. Somado a isto, os IT são tipicamente preenchidos com gás hélio à pressão de 10^{-3} Torr e as colisões com as moléculas de hélio “amortecem” a energia cinética dos íons, ajudando a centralizar a trajetória dos mesmos (DASS 2007). Em seguida, os íons são ejetados para fora do analisador pela aplicação de uma rampa crescente de rádio-frequência (RF), que consequentemente desestabiliza os íons, ejetando-os em direção ao detector de forma crescente, de acordo com seus valores de m/z (DASS, 2007; HOFFMANN; STROOBANT, 2007).

Os detectores representam a porção final dos espectrômetros de massas. Estes funcionam por meio da conversão dos feixes de íons em sinais elétricos, que podem ser amplificados, armazenados e traduzidos em dados que sejam rapidamente interpretados pelos olhos humanos ou ainda em uma série de pulsos

que possam ser monitorados e contados. Os principais detectores são o Copo de Faraday e os Multiplicadores de Elétrons.

2.6.2.4 Copo de Faraday (Faraday cup)

O copo de Faraday opera no princípio de que uma mudança da carga em uma placa de metal resulta em um fluxo de elétrons, e, conseqüentemente, é gerada uma corrente elétrica. Um íon que atinja a superfície da placa induz a ejeção de vários elétrons. Esta emissão temporária de elétrons induz uma corrente no copo e cria uma pequena amplificação da corrente gerada pela colisão do íon no copo. As principais vantagens dos detectores deste tipo são o baixo custo, a simplicidade mecânica e elétrica e a resposta independente da energia, da massa e da natureza química dos íons (DASS, 2007).

2.6.2.5 Multiplicadores de Elétrons

Um multiplicador de elétrons é um dos meios mais simples e mais utilizados atualmente para se detectar íons. Neste tipo de detector, utiliza-se uma série de placas coletoras de íons em série, mantidos em potencial crescente. Os íons atingem a superfície da primeira placa, resultando na transmissão de elétrons. Estes, por sua vez, são atraídos pela segunda placa, onde são gerados novos elétrons, resultando em uma cascata de elétrons. O ganho típico da amplificação da corrente gerada pela cascata de elétrons é da ordem de 1.000.000 de vezes. As

principais vantagens dos multiplicadores de elétrons são a extrema sensibilidade, que permite a detecção de até um único íon, o tempo de resposta curto (da ordem de nanossegundos) e o baixo nível de ruído (DASS, 2007).

2.6.3 ANÁLISE PROTEÔMICA QUANTITATIVA

A análise proteômica 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 protéico de um sistema em um dado momento, o número de estudos trazendo informações sobre o nível de expressão protéica também vem crescendo nos últimos anos (ZHU; SMITH; HUANG 2010). A quantificação das diferenças entre dois ou mais estados fisiológicos de um sistema biológico é uma das tarefas mais importantes e também um grande desafio para as técnicas proteômicas. A análise de uma mistura complexa de proteínas requer métodos de separação, identificação e então quantificação das proteínas. Além disso, são necessárias ferramentas para integrar e analisar todos os dados (AEBERSOLD; MANN 2003). Dentre as diversas técnicas e instrumentos, algumas estratégias vêm sendo comumente utilizadas (AEBERSOLD; MANN 2003; COLUCCI- D'AMATO et al. 2011).

A primeira estratégia consiste em um método clássico para análise quantitativa de misturas complexas de proteínas que combina 2D-PAGE e MS. Isto é, a separação das proteínas é feita em duas dimensões. Na primeira dimensão, as proteínas são separadas de acordo com seu pI (ponto isoelétrico), utilizando a focalização isoelétrica. Posteriormente, na segunda dimensão, são separadas de acordo com seu volume molecular, empregando eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS, resultando em uma separação bidimensional contendo *spots* de proteínas que diferem em tamanho molecular e/ou pI (GRAVES; HAYSTEAD 2002; PANDEY; MANN 2000). Após a separação, as proteínas podem ser visualizadas no

próprio gel por métodos de coloração como o azul brilhante de *Coomassie*, nitrato de prata, compostos fluorescentes, autorradiografia ou detecção com imunoquímicos (CANDIANO et al. 2004; PANDEY; MANN 2000). Após coloração, os géis são escaneados, e com o uso de um *software* especial, os *spots* em cada gel são alinhados e sua intensidade individual é mensurada (GRAVES; HAYSTEAD 2002; PANDEY; MANN 2000). As proteínas de interesse são excisadas do gel, digeridas (usualmente com tripsina), e identificadas por MS ou espectrometria de massas *tandem* (MS/MS) (GRAVES; HAYSTEAD 2002; PENG; GYGI 2001). O desenvolvimento da eletroforese de fluorescência diferencial em gel bidimensional (2D-DIGE) trouxe maior confiabilidade em relação à quantificação de proteínas, pois as amostras comparadas correm juntas no mesmo gel, eliminando a potencial variação dos géis em corridas distintas (LILLEY; FRIEDMAN 2004). No entanto, com certa frequência os *spots* no gel 2D podem conter mais do que uma proteína, tornando a quantificação ambígua, uma vez que não mostra qual dessas proteínas em um mesmo *spot* sofreu alteração na expressão. Além disso, o gel 2D está sujeito às limitações impostas pelo método, as quais incluem faixa dinâmica limitada, problema na reprodutibilidade, dificuldades para analisar proteínas de membrana devido a sua alta hidrofobicidade, identificar proteínas pouco abundantes e detectar proteínas com peso molecular e valores de pI extremos (ZHU; SMITH; HUANG 2010).

Na segunda estratégia estão as chamadas técnicas de proteômica “*shotgun*” que consistem na análise direta dos peptídeos provenientes de uma mistura complexa de proteínas, digeridas (proteômica do tipo *bottom-up*) ou não (proteômica do tipo *top-down*) (ENG; MCCORMACK; YATES 1994; MOTOYAMA; YATES 2008). A separação é realizada a nível de peptídeos e não proteínas (WASHBURN; WOLTERS; YATES 2001). Os fragmentos dos peptídeos são separados por LC-MS/MS (cromatografia líquida - espectrometria de massas *tandem*), e empregando algoritmos computacionais, como SEQUEST ou MASCOT, podem ser então realizadas buscas dos espectros que possuam sequências equivalentes àsquelas existentes nos bancos de dados para identificar as proteínas presentes na mistura (MOTOYAMA; YATES 2008; PERKINS et al. 1999). Em 2001, foram identificadas 1484 proteínas do lisado celular de levedura utilizando cromatografia líquida multidimensional combinada com espectrometria de

massas *tandem* (MDLC – MS/MS) (WASHBURN; WOLTERS; YATES 2001). Atualmente, esta metodologia é conhecida como tecnologia multidimensional para identificação de proteínas (MudPIT), e combina duas ou mais formas de LC para melhorar o poder de resolução e a separação dos fragmentos peptídicos antes de submetê-los para análise no espectrômetro de massas (MOTOYAMA; YATES 2008). Uma variedade de separações na primeira dimensão, nem todas baseadas em LC, têm sido utilizadas: cromatografia por exclusão molecular (SEC) (OPITECK; JORGENSEN 1997); troca catiônica forte (SCX) (JIANG et al. 2007; LINK et al. 1999; WASHBURN; WOLTERS; YATES 2001); troca aniônica forte (SAX) (ZHOU et al. 2011); eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida em SDS (SDS-PAGE) (BALCERZAK et al. 2008) e técnicas de focalização isoelétrica (IEF) (CARGILE et al. 2005; CHEN et al. 2002).

A combinação de variadas técnicas cromatográficas em inúmeras dimensões é em teoria possível, porém considerações práticas na interface dos métodos com o MS limita o uso de muitas delas. Importantes questões incluem o tempo necessário para as análises, o tipo de tampão usado para separação prévia ao MS, e uma integração efetiva entre as duas dimensões e o MS (MOTOYAMA; YATES 2008). O último passo, geralmente acoplado diretamente ao MS, é frequentemente a cromatografia líquida de fase reversa (RPLC) por apresentar uma alta resolução na separação dos peptídeos, ser efetivo na remoção de sal das amostras, e compatível com a detecção por ESI (ionização por eletrospray) e MS (CLAESSENS; VAN STRATEN 2004).

Inúmeros métodos utilizando marcadores isotópicos estáveis têm sido desenvolvidos para análise proteômica quantitativa do tipo “*shotgun*”. Dentre esses métodos estão marcadores utilizados em cultura de células (*in vivo*) como SILAC - *Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell Culture* (análise da razão de isótopos estáveis em aminoácidos em cultura de células) e $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ marcadores metabólicos, além dos marcadores para estudos *in vitro*, como ICAT - *Isotope-Coded Affinity Tag* (marcador de afinidade enriquecido isotopicamente), MCAT - *Mass-Coded Abundance Tagging*, ICPL - *Isotope Coded Protein Labeling* (proteínas codificadas com marcadores isotópicos), $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ marcadores enzimáticos, TMT - *Tandem Mass Tags* (marcadores de massa sequencial), iTRAQ - *Isobaric Tags for Relative and Absolute Quantification* (marcador isobárico para quantificação relativa

e absoluta), além de outros marcadores químicos (CHEN; YATES 2007; COLUCCI-D'AMATO et al. 2011; UNWIN; GRIFFITHS; WHETTON 2010). Apesar da valiosa contribuição aos estudos das alterações proteicas em misturas complexas, muitas técnicas que utilizam marcadores isotópicos apresentam potenciais limitações, como o aumento do tempo e complexidade no preparo das amostras, necessidade de amostra altamente concentrada, alto custo dos reagentes, marcações incompletas, interferência do sinal devido à co-eluição de componente de massa similar, e a necessidade de um *software* específico para a quantificação (CHELIUS; BONDARENKO 2002; ZHU; SMITH; HUANG 2010). Além disso, dentre os métodos citados, apenas TMT e iTRAQ permitem a comparação de múltiplas (até 8) amostras ao mesmo tempo. Os outros métodos utilizando marcadores podem comparar somente a quantidade relativa de proteínas entre 2 ou 3 amostras diferentes (SCHULZE; USADEL 2010).

2.6.3.1 Análise proteômica quantitativa livre de marcadores (*Label-free*)

Na tentativa de resolver as questões existentes nos métodos utilizando marcadores, houve um aumento no interesse nas técnicas de análise proteômica quantitativa do tipo *shotgun* livre de marcadores (*label-free*) (CHEN; YATES 2007; COLUCCI-D'AMATO et al. 2011).

Em geral, todos os métodos de análise proteômica quantitativa livre de marcadores incluem os seguintes passos fundamentais: preparo da amostra (extração da proteína, redução, alquilação e digestão); separação dos peptídeos utilizando cromatografia líquida uni ou bidimensional (LC ou LC/LC) e análise por MS/MS; análises dos dados incluindo identificação peptídeo/proteína, quantificação, e análise estatística (ZHU; SMITH; HUANG 2010). Nos métodos que utilizam marcadores, diferentes amostras de proteínas antes ou após a digestão são marcadas com os respectivos isótopos e combinadas em um único tubo e o *pool* é analisado em uma única corrida de LC-MS/MS ou LC/LC- MS/MS. Já nos métodos quantitativos livre de marcadores, as amostras são preparadas separadamente, e

então submetidas individualmente à corrida de LC-MS/MS ou LC/LC- MS/MS (ZHU; SMITH; HUANG 2010). Os métodos para a quantificação de proteínas são geralmente baseados nas alterações da intensidade dos íons (áreas ou alturas dos picos dos peptídeos na cromatografia), e/ou na contagem dos espectros das proteínas identificadas após análise de MS/MS (BANTSCHEFF et al. 2007; BECKER; BERN 2011). A intensidade do pico do peptídeo ou a contagem dos espectros são determinadas individualmente para cada corrida LC-MS/MS ou LC/LC-MS/MS e alterações na abundância da proteína são calculadas por comparação direta entre as diferentes análises (ZHU; SMITH; HUANG 2010).

PROPOSIÇÃO

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo principal desse trabalho foi comparar qualitativamente e quantitativamente o perfil protéico de AEPs formadas sem estimulação salivar e com estimulação salivar (mecânica e química), utilizando, como ferramentas analíticas nLC- ESI-MS/MS.

MATERIAIS E MÉTODOS

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Seleção dos Voluntários

O protocolo deste estudo foi submetido e devidamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da FOB-USP (CAAE 10678312.4.0000.5417). Os voluntários participaram após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Foram selecionados para este estudo nove voluntários com idade de 18 a 35 anos, de ambos os gêneros (8 feminino, 1 masculino), em bom estado de saúde geral e bucal. Os critérios de exclusão foram: tabagismo, alcoolismo, qualquer tipo de doenças sistêmicas ou bucais (qualquer condição bucal e/ou sistêmica que possa afetar a composição dos fluidos bucais), presença de cálculos dentários, tratamento ortodôntico em qualquer fase, qualquer indicativo de distúrbio ou dor têmporo-mandibular e, por fim, uso contínuo de medicamentos. Atendendo todos os critérios necessários para a realização da pesquisa, os voluntários selecionados foram em sua maioria alunos de pós-graduação da Faculdade de Odontologia de Bauru.

4.2 Formação e Coleta da AEP

Os experimentos tiveram início às 08:00 horas da manhã de cada dia e término antes das 14:00 horas, em função das alterações no fluxo salivar decorrentes do ciclo circadiano.

Previamente ao período de formação da película adquirida (e para todos os grupos), os voluntários receberam uma meticulosa profilaxia dentária com pedra pomes (não contendo aditivos) para que a AEP já existente sobre a superfície dos seus dentes fosse completamente removida.

O tempo de 120 minutos de formação foi estipulado para que se obtivesse uma AEP espessa, porém evitando agregação bacteriana, o que poderia interferir nos resultados. Além disso, durante este período, os voluntários foram privados do consumo de alimentos e bebidas. Os grupos em estudo foram:

Grupo 1: AEP formada sem estímulo do fluxo salivar;

Grupo 2: AEP formada sob estímulo mecânico do fluxo salivar;

Grupo 3: AEP formada sob estímulo químico do fluxo salivar.

Para o Grupo 1, após a profilaxia dentária aguardou-se 120 minutos para que a película adquirida fosse formada naturalmente sobre o esmalte. Após o tempo em questão, foi feita a coleta da AEP como descrito posteriormente.

Para o Grupo 2, a profilaxia dentária foi realizada e então os voluntários foram instruídos a mastigar Parafilm® durante os 120 minutos de formação e engolir a saliva produzida normalmente.

Já para o Grupo 3, a profilaxia dentária foi realizada da mesma forma e então o fluxo salivar foi estimulado quimicamente/gustativamente através da aplicação de 50 µL de ácido cítrico 2 % (p/v) (utilizando uma micropipeta) em ambas as bordas laterais da língua, em intervalos de 1 minuto, durante 120 minutos (BURLAGE et al., 2005).

Para a realização da coleta da AEP, cada quadrante da boca foi enxaguado e seco com jato de ar por duas vezes e isolado com rolos de algodão (Isolamento relativo). A película adquirida foi então coletada com auxílio de um papel filtro de eletrodos (*electrode wick filter paper*, Bio- Rad, Hercules, CA) de 5X10 mm que fora previamente mergulhado em ácido cítrico 3%. Este papel filtro foi esfregado (sem pressão) sobre as superfícies vestibulares dos dentes com auxílio de uma pinça

(SIQUEIRA et al., 2007). Neste estudo, foram utilizadas pinças ortodônticas para colagem de braquetes ao invés de pinças odontológicas clínicas, em função de não haver a necessidade de aplicar pressão na haste para que o papel filtro fosse preso. Isto facilitou o manuseio do conjunto e proporcionou melhor precisão da área a ser esfregada (coletada), uma vez que a coleta não deveria incluir o terço cervical/gengival da superfície vestibular dos dentes. Foi utilizado um papel filtro para cada Quadrante (Incisivos centrais a Primeiros molares). Os *wick filters* foram armazenados em criotubos de 2 mL a -80°C até análise.

4.3 Preparo das amostras

O preparo das amostras foi realizado no Siqueira Lab, Schulich School of Medicine & Dentistry, University of Western Ontario, sob a supervisão do colaborador prof. Dr. Walter Luiz Siqueira.

Para tanto, as amostras foram transportadas ainda nos papéis filtro, dentro de criotubos de 2 mL, à temperatura ambiente. Ao chegarem no laboratório, foram mantidas a -80°C até análise.

4.3.1. Digestão em papel

Para o preparo das amostras, inicialmente foi feito um “pool” dos papéis filtro de todos os voluntários, totalizando 36 papéis para cada grupo. Estes papéis

contendo as películas foram picotados com uma tesoura clínica previamente desinfetada com álcool 70 e foram dispostos em um único tubo Falcon para cada Grupo.

Em seguida, foram adicionados 400 μL de solução 1 (ureia 4M + DTT 10 mM + NH_4HCO_3 50 mM, pH 7,8) a cada tubo. As amostras foram sonicadas por 1 minuto e então incubadas por 1 hora à temperatura ambiente. Passado este tempo, foram adicionados às amostras 2000 μL de solução 2 (50mM NH_4HCO_3 , pH 7,8). Nesta fase, o pH das amostras foi aferido e ajustado para 7,8 com TFA 50% (ácido trifluoroacético) ou NaOH 1M (Hidróxido de sódio), se necessário, para que a digestão trípica tivesse o seu efeito máximo (pH ótimo para a tripsina). A estimativa da quantidade de proteína presente em cada grupo foi realizada previamente através da técnica do ácido bicinconínico (mBCA - Thermo Fisher Pierce, Rockford, IL, USA) em amostras piloto. Foi então adicionado o correspondente a 2% em peso de tripsina (Promega, Madison, WI, USA) para cada grupo. Para otimizar a digestão, as amostras foram incubadas por um período de 18 horas a 37°C em banho Maria.

Após a incubação, os tubos Falcon contendo as amostras foram centrifugados a 1500 G durante 20 minutos e o sobrenadante foi extraído. O processo de centrifugação foi repetido por duas vezes para que se conseguisse extrair maior quantidade de líquido e para que fossem eliminadas as fibras dos papéis filtro. Este sobrenadante foi dividido em microtubos de 2 mL e mais uma vez centrifugados por 20 minutos a 14.000 G para garantir que fossem eliminadas quaisquer partículas sólidas.

Uma alíquota das amostras (75 μL) foi separada em um novo microtubo para a realização da quantificação proteica pelo método mBCA. Esta quantificação pós-digestão teve o intuito de estimar a quantidade de amostra exata necessária para a realização da cromatografia líquida e espectrometria, a fim de que fossem preparadas quantidades suficientes, porém sem desperdício de amostra. Estas alíquotas foram secas no *SpeedVac* e dessalinizadas através de *ZipTip®*, uma vez que a solução 1 (ureia 4 M + DTT 10 mM + NH_4HCO_3 50 mM, pH 7,8) não é compatível com os reagentes deste método de quantificação. Após dessalinizadas, foram secas novamente.

A concentração média de proteínas foi de: 102 µg/mL no Grupo 1, 72 µg/mL no Grupo 2 e 132 µg no Grupo 3 (Tabela 1 A, B). No restante da amostra realizou-se também a técnica ZipTip® para purificação e dessalinização das amostras, conforme descrito anteriormente, e ao final do processo as amostras foram secas.

Tabela 1 (A) – Análise da concentração proteica nas amostras dos diferentes grupos (método mBCA).

A	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09
B	0,09	0,10	0,12	0,12	0,08	0,08	0,09	0,08	0,09	0,09	0,09	0,09
C	0,08	0,08	0,09	0,09	0,08	0,08	0,08	0,08	0,09	0,09	0,08	0,08
D	0,08	0,08	0,09	0,09	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08
E	0,08	0,08	0,08	0,09	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08
F	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08
G	2,53	0,74	0,47	0,30	0,19	0,18	0,24	0,18	0,16	0,55	0,43	0,19
H	2,54	0,78	0,48	0,30	0,19	0,18	0,26	0,18	0,15	0,55	0,44	0,20
	2,53	0,74	0,47	0,30	0,19	0,18	0,17	0,18	0,16	0,55	0,43	0,19
	2,54	0,78	0,48	0,30	0,19	0,18	0,20	0,18	0,15	0,55	0,44	0,20
Média	2,54	0,76	0,48	0,30	0,19	0,18	0,19	0,18	0,16	0,55	0,44	0,19
Correção da média	2,38	0,61	0,32	0,15	0,03	0,02	0,03	0,02	0,00	0,39	0,28	0,03
[proteína] / µg/ml	200	40	20	10	5,00	2,50	1,00	0,50	0,00	G1 25,5	G2 18,0	G3 2,55
y da equação	2,41	0,61	0,31	0,15	0,07	0,03	0,01	0,00	-0,01	0,39	0,28	0,03
Diferença	- 0,03	0,00	0,01	-0,01	-0,04	-0,01	0,02	0,02	0,01	0,00	0,00	0,00
recuperação / µg										G1 7,92	G2 5,60	G3 0,79

$$y = -2E-05x^2 + 0,0161x - 0,0065$$

$$R^2 = 0,99938$$

4.4 Cromatografia Líquida tandem Espectrometria de Massas (LTQ-Velos, Thermo Scientific)

A separação dos peptídeos e as análises espectrométricas foram feitas utilizando nano-HPLC Proxeon (Thermo Scientific, Sao Jose, CA, EUA), a qual permite cromatografia líquida *in-line* com a coluna capilar. Esta coluna era de 75 mm x 610 cm (Pico TipTM EMITTER, New Objective, Woburn, MA) preenchida com resina C18 com poros de 5 µm de diâmetro e 200 Å (Michrom BioResources, Auburn, CA), acoplado ao espectrômetro de massas (LTQ- Velos, Thermo Scientific, Sao Jose, CA, EUA), usando ionização por *eletrospray* em modo de busca, na faixa de valores m/z 390-2000 em tandem MS/MS.

Para isto, quantidades iguais de todas as amostras já secas foram ressuspensas em 20 µL de ácido fórmico 1% e então submetidas a nLC-ESI-MS/MS. O HPLC de fase reversa *nanoflow* foi desenvolvido com um gradiente linear de 85 minutos variando de 0 a 100% de solvente B (ácido fórmico 0,1% em acetonitrila), num fluxo de 200 nL/min, com pressão máxima de 280 bar. A voltagem e temperatura do capilar de transferência de íons foram 1,8 kV e 250°C, respectivamente. Cada espectro (MS) obtido foi seguido por seleção sequencial automatizada de sete peptídeos para CID, com exclusão dinâmica dos íons previamente selecionados.

Os dados de MS/MS foram confrontados com o banco de dados de proteínas humanas (UniProt and TrEMBL, Swiss Institute of Bioinformatics, Geneva, Switzerland, <http://ca.expasy.org/sprot>) usando o algoritmo SEQUEST no software Proteome Discoverer 1.3 (Thermo Scientific, San Jose, CA, USA). Os filtros utilizados no SEQUEST como critério aplicado aos espectros MS/MS foram: 1.5; 2.5; 3.1; 3.1; 4.5 para o Xcorr aplicado em adição ao filtro Percolator. Os resultados das buscas foram filtrados a uma taxa de Falsas Descobertas de 1% utilizando uma estratégia de pesquisa de banco de dados inversa.

4.5 Integração e Quantificação proteômica

Para análise proteômica quantitativa, três arquivos a partir dos dados –MS de cada grupo foram analisados usando o software SIEVE (Versão 2.0 *Thermo Scientific*, San Jose, CA, EUA). O processamento dos sinais foi realizado num total de 9 arquivos MS brutos. O fluxo de trabalho experimental do SIEVE foi definido como controle de comparação para as análises, onde uma classe de amostras é comparada com um ou mais diferentes classes de amostras. Neste estudo, as amostras controle/ sem estimulação do fluxo salivar (G1) foram comparadas com as amostras nas quais houve estimulação do fluxo salivar (G2 e G3). Para a etapa de alinhamento, um único arquivo MS pertencente ao Grupo 1 foi selecionado como o arquivo de referência e todos os outros processos foram ajustados para gerar a melhor correlação a este. Após o alinhamento, os processos de detecção e integração (ou *framing*) foram realizados utilizando o nível de dados MS com um recurso denominado "quadros de MS2 Scans". Com este tipo de enquadramento (*framing*), somente os valores MS com razão massa-carga (m/z) associados às análises MS2 são utilizados. Quaisquer medições de m/z que não estivessem presentes em MS2 foram ignoradas. O software gerou então os quadros (*frames*), e a partir da integração foram feitas as análises estatísticas para cada quadro (*frame*).

Em seguida as sequências de peptídeos obtidas a partir da pesquisa de banco de dados usando o Algoritmo SEQUEST no *Proteome Discoverer* 1.3 foram importadas para o SIEVE. O filtro Percolator foi aplicada às sequências peptídicas durante a importação, eliminando todas as seqüências com q-value maiores que 1% (taxa de falsa detecção). Os peptídeos foram agrupados em proteínas e então foi calculada a relação de proteínas e o valor de p. Foi utilizada uma média ponderada das intensidades de peptídeos para o cálculo das proteínas. Desta forma, os peptídeos com menor variação em suas medições de intensidade têm maior peso na taxa global de proteínas. Isto é feito para diminuir a variância das quantidades de proteína com base no nível de variação dos peptídeos que compõem cada proteína. Somente proteínas observadas em todos os três grupos foram quantificadas. O Grupo 1, como já dito, foi utilizado como nosso grupo padrão/controle e os outros

dois grupos foram com este comparados. A abundância relativa de uma proteína individual a partir do nível do Grupo 1 foi considerada significativamente diferente quando os valores observados foram, 0,75 para diminuição e 1,25 para aumento de abundância. Além disso, foi considerado o valor de $p < 0.05$, como descrito.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a coleta da AEP e tripsinização, quantidades iguais de peptídeos foram submetidos a nanoflow LC-ESI-MS/MS. O cromatograma base-pico da cromatografia de fase reversa monitorada pelo espectrômetro de massas representa a intensidade de todos os íons de peptídeos da amostra em uma única corrida. Para cada grupo foram realizadas no mínimo 3 corridas, ou seja, 3 cromatogramas de cada grupo deveriam ter espectros parecidos para serem considerados bons e então utilizados para as quantificações (Figura 1). Os proteomas dos três diferentes grupos mostraram uma consistente eluição de proteínas/peptídeos no intervalo de tempo que vai dos 12 aos 45 minutos de corrida. Os peptídeos encontrados foram identificados através de busca no banco de dados utilizando o algoritmo SEQUEST, seguindo os critérios descritos nos Métodos.

Figura 1 base-pico do Grupo 1 (grupo controle/ sem estimulação do fluxo salivar). A separação de peptídeos foi sucedida utilizando coluna de cromatografia líquida de fase reversa com nano fluxo, e gradiente de eluição variando de 0 a 100% de solvente B em 85 minutos.

Foram encontradas proteínas identificadas na AEP em estudos clássicos (MORENO et al., 1979; OPPENHEIM et al., 1986; HAY et al., 1988) como a alfa amilase, PRP ácidas, Cistatinas, Estaterina e Mucinas (SIQUEIRA et al., 2007). No total, foram encontradas 115 proteínas neste estudo, sendo que todas foram identificadas por no mínimo dois peptídeos distintos e apareceram em pelo menos três corridas de cada Grupo (Tabela 2). Destas, somente 51 foram identificadas nos três Grupos. Nove proteínas identificadas foram específicas para o Grupo 1, onze para o Grupo 2 e dez para o Grupo 3. Vinte e sete proteínas foram identificadas apenas nos Grupos 1 e 2, e catorze foram identificadas apenas nos Grupos 1 e 3. Nenhuma proteína foi comum apenas para os Grupos 2 e 3 (Figura 2).

Figura 2. Diagrama de Venn mostrando a relação do número de proteínas identificadas em cada Grupo e suas interrelações. G1 - grupo controle/ sem estimulação do fluxo salivar; G2 – grupo com estimulação mecânica do fluxo salivar; G3 – grupo com estimulação química do fluxo salivar.

Tabela 2 - Proteínas identificadas em três corridas para cada Grupo. G1 - grupo controle/ sem estimulação do fluxo salivar; G2 – grupo com estimulação mecânica do fluxo salivar; G3 – grupo com estimulação química do fluxo salivar

	Nº de acesso	Nome da proteína
Proteínas presentes em Todos os Grupos	A7Y9J9	Mucin 5AC, oligomeric mucus/gel-forming
	A8K2H9	highly similar to Homo sapiens keratin 13 (KRT13), transcript variant 1, mRNA
	A8K2U0	Alpha-2-macroglobulin-like protein 1
	B1AN48	Small proline-rich protein 3
	B4DGT4	highly similar to Histone deacetylase 5
	B4DPR2	highly similar to Serum albumin
	B4DZ16	cDNA FLJ58649
	B4E1T1	highly similar to Keratin, type II cytoskeletal 5
	Nº de acesso	Nome da proteína
	B5ME49	Mucin-16
	B7Z5K0	highly similar to Homo sapiens membrane-associated ring finger (C3HC4) 7 (MARCH7), mRNA
	B7ZMD7	Amylase, alpha 1A (Salivary)
	B8ZZJ3	Alstrom syndrome protein 1
	C9JA77	X
	E7EMQ1	Carbonic anhydrase 6
	E7EQT2	Mucin-4 beta chain
	E7ESM2	Urokinase-type plasminogen activator chain B
	E7ETI5	G-protein-coupled receptor 98
	F4MHJ1	Ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat protein Y-linked transcript variant 97
	F6KPG5	Albumin (Fragment)
	G3CIG0	MUC19 variant 12
	H0Y930	Extracellular matrix protein FRAS1
	H6VRF8	Keratin 1
	H7BXM7	X
	H7BYJ0	Mucin-4
	O15079	Syntaphilin
	P01034	Cystatin-C
	P01036	Cystatin-S

	P01037	Cystatin-SN
	P01833	Polymeric-immunoglobulin receptor
	P01877	Ig alpha-2 chain C region
	P02808	Statherin
	Nº de acesso	Nome da proteína
	P02810	Salivary acidic proline-rich phosphoprotein 1/2
	P02812	Basic salivary proline-rich protein 2 (Fragment)
	P02814	Submaxillary gland androgen-regulated protein 3B
	P04080	Cystatin-B
	P06733	Alpha-enolase
	P07737	Profilin-1
	P09228	Cystatin-SA
	P0CG05	Ig lambda-2 chain C regions
	P15515	Histatin-1
	P15516	Histatin-3
	P19961	Alpha-amylase 2B
	P28325	Cystatin-D
	Nº de acesso	Nome da proteína
	P35908	Keratin, type II cytoskeletal 2 epiderma
	P54652	Heat shock 70 kDa protein 2
	Q8TAX7	Mucin-7
	Q8WVD6	PHTF2 protein
	Q8WZ42	Titin
	Q9HC84	Mucin-5B
	Q9NR09	Baculoviral IAP repeat-containing protein 6
	Q9NV58	E3 ubiquitin-protein ligase RNF19A
Proteínas presentes nos Grupos 1 e 2	A0M8Q9	C1 segment protein
	A8K5I6	highly similar to Homo sapiens cornulin (CRNN), mRNA
	B2R853	highly similar to Homo sapiens keratin 6E (KRT6E), mRNA
	B3W5Y6	Serpin B3
	B4DL17	highly similar to Keratin, type I cytoskeletal 13
	B4DRR0	highly similar to Keratin, type II cytoskeletal 6A

Proteínas presentes nos Grupos 1 e 3	E7EQV7	Keratin, type II cytoskeletal 6C
	G3V1A4	Cofilin 1 (Non-muscle), isoform CRA_a
	P01040	Cystatin-A
	P01857	Ig gamma-1 chain C region
	P04792	Heat shock protein beta-1
	P05109	Protein S100-A8
	P06702	Protein S100-A9
	Nº de acesso	Nome da proteína
	P07355	Annexin A2
	P07737	Profilin-1
	P27482	Calmodulin-like protein 3
	P31947	14-3-3 protein sigma
	P35908	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal
	P47929	Galectin-7
	P62805	Histone H4
	P68371	Tubulin beta-4B chain
	Q08188	Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase E
	Q0KKI6	Immunoglobulin light chain (Fragment)
	Q3LR79	Hemoglobin beta (Fragment)
	Q5T8M8	Actin, alpha 1, skeletal muscle
	Q8WVW5	Putative uncharacterized protein (Fragment)
	Q96KK5	Histone H2A type 1-H
	B4DZ16	cDNA FLJ58649
	B4E1Z2	moderately similar to Protein EMSY
	B5ME49	Mucin-16
	Nº de acesso	Nome da proteína
	C3PTT6	Pancreatic adenocarcinoma upregulated factor
	E7EWX9	X
	H6VRF8	Keratin 1
	O95678	Keratin, type II cytoskeletal 75
	P01833	Polymeric-immunoglobulin receptor
	P01861	Ig gamma-4 chain C region
	P63104	14-3-3 protein zeta/delta
	P98164	Low-density lipoprotein receptor-related protein 2

Proteínas presentes nos Grupos 2 e 3	Q0PNF2	FEX1
	Q5T123	SH3 domain-binding glutamic acid-rich-like protein 3
	Q96SB0	Anti-streptococcal/anti-myosin immunoglobulin lambda light chain variable region (Fragment)
	---	---
	A5D903	PRB1 protein
Proteínas presentes Apenas no Grupo 1	H7C4X9	Protein kinase C-binding protein 1
Proteínas presentes Apenas no Grupo 2	Nº de acesso	Nome da proteína
	P01024	Complement C3
	P04406	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
	P10161	Basic salivary proline-rich protein 4 allele M (Fragment)
	P30740	Leukocyte elastase inhibitor
	Q14568	Putative heat shock protein HSP 90-alpha A2
	Q75T53	Putative uncharacterized protein
	Q96DR5	Short palate, lung and nasal epithelium carcinoma-associated protein 2
	A1A4E9	Keratin 13
	B4DRW1	highly similar to Keratin, type II cytoskeletal 4
	O60744	Thioredoxin delta 3 (Fragment)
	P02533	Keratin, type I cytoskeletal 14
	P04083	Annexin A1
	P08779	Keratin, type I cytoskeletal 16
	P12273	Prolactin-inducible protein
	P29508	Serpin B3
	P31025	Lipocalin-1
	Q06830	Peroxisomal oxidoreductin-1
	Nº de acesso	Nome da proteína
Proteínas presentes Apenas no Grupo 3	Q6IBG5	MYL6 protein
	B7WNW7	HEAT repeat-containing protein 3
	P01834	Ig kappa chain C region
	P01871	Ig mu chain C region

P09211	Glutathione S-transferase P
P23284	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B
P23284	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B
P25311	Zinc-alpha-2-glycoprotein
P35527	Keratin, type I cytoskeletal 9
P54108	Cysteine-rich secretory protein 3
Q9HCY8	Protein S100-A14

Tabela 3 – Proteínas identificadas na AEP em pelo menos 3 corridas, separadas por Grupo e classificadas. a Origem Citoplasmática; b Origem Extracelular; c Origem no Núcleo; d Origem no Citoesqueleto; e Origem em Organelas; f Origem na Membrana celular; g Origem em Proteínas desconhecidas; h Interação Proteína/Proteína; i Ligação em Cálcio/Fosfato; j Interação Molecular Desconhecida; k Outras Interações Moleculares; l Metabolismo; m Regeneração Tecidual; n Antimicrobiana; o Resposta Imune; p Lubrificação; q Biomineralização; r Função Biológica Desconhecida. G1 - grupo controle/ sem estimulação do fluxo salivar; G2 – grupo com estimulação mecânica do fluxo salivar; G3 – grupo com estimulação química do fluxo salivar.

Nº Acesso	DESCRIÇÃO	G1	G2	G3
A0M8Q9	C1 segment protein ^{g, h, l, o}	Sim	Sim	-
A1A4E9	Keratin 13 ^{a, d, e, h, m}	-	Sim	-
A5D903	PRB1 protein ^{g, j, r}	Sim	-	-
A7Y9J9	Mucin 5AC, oligomeric mucus/gel-forming ^{a, b, e, h, m, n, p, q}	Sim	Sim	Sim
A8K2H9	highly similar to Homo sapiens keratin 13 (KRT13), transcript variant 1, mRNA ^{d, h, m}	Sim	Sim	Sim
A8K2U0	Alpha-2-macroglobulin-like protein 1 ^{b, h, k, l}	Sim	Sim	Sim
A8K5I6	highly similar to Homo sapiens cornulin (CRNN), mRNA ^{a, b, c, d, e, f, i, m, q}	Sim	Sim	-
B1AN48	Small proline-rich protein 3 ^{a, d, h, l, o}	Sim	Sim	Sim
B2R853	highly similar to Homo sapiens keratin 6E (KRT6E), mRNA ^{b, h, m}	Sim	Sim	-
B3W5Y6	Serpin B3 ^{a, b, e, k, m, o}	Sim	Sim	-
B4DGT4	highly similar to Histone deacetylase 5 ^{b, k, m}	Sim	Sim	Sim
B4DL17	highly similar to Keratin, type I cytoskeletal 13 ^{a, d, e, h, m}	Sim	Sim	-
B4DPR2	highly similar to Serum albumin ^{b, g, k}	Sim	Sim	Sim
B4DRR0	highly similar to Keratin, type II cytoskeletal 6A ^{d, h, m}	Sim	Sim	-
B4DRW1	highly similar to Keratin, type II cytoskeletal 4 ^{d, h, m}	-	Sim	-
B4DZ16	cDNA FLJ58649 ^r	Sim	Sim	Sim
B4E1T1	highly similar to Keratin, type II cytoskeletal 5 ^{d, h, m}	Sim	Sim	Sim

B4E1Z2	cDNA FLJ58353, moderately similar to Protein EMSY ^{g, j, r}	Sim	-	Sim
B5ME49	Mucin-16 ^{g, j, r}	Sim	Sim	Sim
B7WNW7	HEAT repeat-containing protein 3 ^{j, r}	-	-	Sim
B7Z5K0	highly similar to Homo sapiens membrane-associated ring finger (C3HC4) 7 (MARCH7), mRNA ^{k, l}	Sim	Sim	Sim
B7ZMD7	Amylase, alpha 1A (Salivary) ^{b, h, i, l, n, q}	Sim	Sim	Sim
B8ZZJ3	Alstrom syndrome protein 1 ^{a, j, r}	Sim	Sim	Sim
C3PTT6	Pancreatic adenocarcinoma upregulated fator ^{j, r}	Sim	-	Sim
C9JA77	χ ^{g, j, r}	Sim	Sim	Sim
E7EMQ1	Carbonic anhydrase 6 ^{b, i, k, l, q}	Sim	Sim	Sim
E7EQT2	Mucin-4 beta chain ^{b, k, r}	Sim	Sim	Sim
E7EQV7	Keratin, type II cytoskeletal 6C ^{d, h, m}	Sim	Sim	-
E7ESM2	Urokinase-type plasminogen activator chain B ^{k, l, o}	Sim	Sim	Sim
E7ETI5	G-protein-coupled receptor 98 ^{deleted}	Sim	Sim	Sim
Nº Acesso	DESCRIÇÃO	G1	G2	G3
E7EWX9	χ ^{deleted}	Sim	-	Sim
F4MHJ1	Ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat protein Y-linked transcript variant 97 ^{j, r}	Sim	Sim	Sim
F6KPG5	Albumin (Fragment) ^{a, b, e, f, h, i, l, m, q}	Sim	Sim	Sim
G3CIG0	MUC19 variant 12 ^{b, j, r}	Sim	Sim	Sim
G3V1A4	Cofilin 1 (Non-muscle), isoform CRA_ ^{a h, i, k, l}	Sim	Sim	-
H0Y930	Extracellular matrix protein FRAS1 ^{f, j, l}	Sim	Sim	Sim
H6VRF8	Keratin 1 ^{d, h, l, o}	Sim	Sim	Sim
H7BXM7	χ ^{deleted}	Sim	Sim	Sim
H7BYJ0	Mucin-4 ^{deleted}	Sim	Sim	Sim
H7C4X9	Protein kinase C-binding protein 1 ^{g, k, l}	Sim	-	-
O15079	Syntaphilin ^{a, b, f, h, l}	Sim	Sim	Sim
O60744	Thioredoxin delta 3 (Fragment) ^{a, b, c, e, h, l, m, o}	-	Sim	-
O95678	Keratin, type II cytoskeletal 75 ^{d, h, m}	Sim	-	Sim
P01024	Complement C3 ^{f, h, k, l, o}	Sim	-	-
P01034	Cystatin-C ^{a, b, d, h, k, l, m}	Sim	Sim	Sim
P01036	Cystatin-S ^{a, b, f, h, n}	Sim	Sim	Sim
P01037	Cystatin-SN ^{b, k, l}	Sim	Sim	Sim
P01040	Cystatin-A ^{a, c, e, h, n}	Sim	Sim	-
P01833	Polymeric-immunoglobulin receptor ^{b, f, j, r}	Sim	Sim	Sim
P01834	Ig kappa chain C region ^{b, f, h, j, o}	-	-	Sim
P01857	Ig gamma-1 chain C region ^{b, f, h, j, o}	Sim	Sim	-
P01861	Ig gamma-4 chain C region ^{b, f, h, j, o}	Sim	-	Sim
P01871	Ig mu chain C region ^{b, f, h, j, o}	-	-	Sim
P01877	Ig alpha-2 chain C region ^{b, f, h, j, o}	Sim	Sim	Sim
P02533	Keratin, type I cytoskeletal 14 ^{d, h, m}	-	Sim	-
P02808	Statherin ^{b, h, i, p, q}	Sim	Sim	Sim
P02810	Salivary acidic proline-rich phosphoprotein ½ ^{b, f, h, i, q}	Sim	Sim	Sim
P02812	Basic salivary proline-rich protein 2 (Fragment) ^{a, d, h, l, o, p}	Sim	Sim	Sim

P02814	Submaxillary gland androgen-regulated protein 3B ^{b, k, r}	Sim	Sim	Sim
P04080	Cystatin-B ^{b, h, n}	Sim	Sim	Sim
P04083	Annexin A1 ^{a, c, j, l}	-	Sim	-
P04406	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase ^{a, c, d, e, f, h, l}	Sim	-	-
P04792	Heat shock protein beta-1 ^{a, c, d, e, h, l, o}	Sim	Sim	-
P05109	Protein S100-A8 ^{a, b, d, f, h, i, k, m, n, o}	Sim	Sim	-
P06702	Protein S100-A9 ^{a, b, c, d, f, h, i, k, m, n, o}	Sim	Sim	-
P06733	Alpha-enolase ^{a, c, e, f, h, k, l, o}	Sim	Sim	Sim
P07355	Annexin A2 ^{a, b, e, f, g, i, k, l}	Sim	Sim	-
P07737	Profilin-1 ^{a, b, c, d, i, k, l}	Sim	Sim	Sim
P08779	Keratin, type I cytoskeletal 16 ^{a, d, e, h, m}	-	Sim	-
P09211	Glutathione S-transferase P ^{a, c, e, h, k, o}	-	-	Sim
P09228	Cystatin-AS ^{b, h}	Sim	Sim	Sim
P0CG05	Ig lambda-2 chain C regions ^{a, d, h, o}	Sim	Sim	Sim
P10161	Basic salivary proline-rich protein 4 allele M (Fragment) ^{b, j, r}	Sim	-	-
Nº Acesso	DESCRIÇÃO	G1	G2	G3
P12273	Prolactin-inducible protein ^{b, h, r}	-	Sim	-
P15515	Histatin-1 ^{c, h, n, q}	Sim	Sim	Sim
P15516	Histatin-3 ^{b, h, k, n, q}	Sim	Sim	Sim
P19961	Alpha-amylase 2B ^{b, j, l}	Sim	Sim	Sim
P23284	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B ^{e, h, k}	-	-	Sim
P25311	Zinc-alpha-2-glycoprotein ^{b, h, k, l}	-	-	Sim
P27482	Calmodulin-like protein 3 ^{a, i, q}	Sim	Sim	-
P28325	Cystatin-D ^{b, h, k}	Sim	Sim	Sim
P29508	Serpin B3 ^{a, b, k, h}	-	Sim	-
P30740	Leukocyte elastase inhibitor ^{a, b, k, h}	Sim	-	-
P31025	Lipocalin-1 ^{b, k, h}	-	Sim	-
P31947	14-3-3 protein sigma ^{a, b, c, h, l, m}	Sim	Sim	-
P35527	Keratin, type I cytoskeletal 9 ^{d, h, l, m}	-	-	Sim
P35908	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal ^{a, b, h, m}	Sim	Sim	Sim
P47929	Galectin-7 ^{a, b, c, h, j, l}	Sim	Sim	-
P54108	Cysteine-rich secretory protein 3 ^{b, e, k, o}	-	-	Sim
P54652	Heat shock 70 kDa protein 2 ^{c, e, f, k, l}	Sim	Sim	Sim
P62805	Histone H4 ^{b, c, d, e, h, k, l}	Sim	Sim	-
P63104	14-3-3 protein zeta/delta ^{a, c, e, g, h, k, l, o}	Sim	-	Sim
P68371	Tubulin beta-4B chain ^{a, b, d, h, k}	Sim	Sim	-
P98164	Low-density lipoprotein receptor-related protein 2 ^{e, f, i, k, l, m}	Sim	-	Sim
Q06830	Peroxiredoxin-1 ^{a, c, e, h, k, l, m, o}	-	Sim	-
Q08188	Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase E ^{a, i, k, l}	Sim	Sim	-
Q0KKI6	Immunoglobulin light chain (Fragment) ^{g, j, r}	Sim	Sim	-
Q0PNF2	FEX1 ^{b, k, r}	Sim	-	Sim
Q14568	Putative heat shock protein HSP 90-alpha A2 ^{a, h, l}	Sim	-	-
Q3LR79	Hemoglobin beta (Fragment) ^{b, h, k, l}	Sim	Sim	-
Q5T123	SH3 domain-binding glutamic acid-rich-like protein 3 ^{g, j, r}	Sim	-	Sim

Q5T8M8	Actin, alpha 1, skeletal muscle ^{a, d, h}	Sim	Sim	-
Q6IBG5	MYL6 protein ^{g, i, r}	-	Sim	-
Q75T53	Putative uncharacterized protein ^{f, k}	Sim	-	-
Q8TAX7	Mucin-7 ^{b, e, k, p, r}	Sim	Sim	Sim
Q8WVD6	PHTF2 protein ^{g, j, r}	Sim	Sim	Sim
Q8WVW5	Putative uncharacterized protein (Fragment) ^{a, d, h}	Sim	Sim	-
Q8WZ42	Titin ^{a, b, c, e, h, i, k, l}	Sim	Sim	Sim
Q96DR5	Short palate, lung and nasal epithelium carcinoma-associated protein 2 ^{b, k, r}	Sim	-	-
Q96KK5	Histone H2A type 1-H ^{c, h, r}	Sim	Sim	-
Q96SB0	Anti-streptococcal/anti-myosin immunoglobulin lambda light chain variable region (Fragment) ^{g, j, r}	Sim	-	Sim
Q9HC84	Mucin-5B ^{b, e, k, p}	Sim	Sim	Sim
Q9HCY8	Protein S100-A14 ^{a, b, h, i, l}	-	-	Sim
Q9NR09	Baculoviral IAP repeat-containing protein 6 ^{e, f, h, l, m}	Sim	Sim	Sim
Q9NV58	E3 ubiquitin-protein ligase RNF19A ^{a, e, f, k}	Sim	Sim	Sim
TOTAL		101	93	77

Sabe-se que a AEP é formada por adsorção seletiva de proteínas salivares à superfície do esmalte (RUDIGER et al., 2002; SIQUEIRA et al., 2007; SIQUEIRA et al., 2009). As proteínas identificadas neste estudo podem ser classificadas e separadas de acordo com suas origens, interações moleculares e funções (ZIMMERMANN et al., 2012). Como já esperado, uma grande porcentagem das proteínas identificadas tem origem extracelular. Isto se deve ao fato de uma grande parte das proteínas da película adquirida ser secretada pelas glândulas salivares (SIQUEIRA et al., 2008). Pôde-se observar ainda que a porcentagem de proteínas com origem citoplasmática também foi grande (Figura 3). Provavelmente isto se deve ao fato de as células da mucosa oral terem um alto *turnover* (DAWES et. al, 2003a). Padrões semelhantes foram observados separadamente nos Grupos de estudo (Figura 3 A,B,C).

Figura 3 (A) - Agrupamento de Proteínas identificadas na AEP **Grupo 1** (grupo controle/ sem estimulação do fluxo salivar) de acordo com suas origens.

Figura 3 (B) - Agrupamento de Proteínas identificadas na AEP **Grupo 2** (grupo com estimulação mecânica do fluxo salivar) de acordo com suas origens.

Figura 3 (C) - Agrupamento de Proteínas identificadas na AEP **Grupo 3** (grupo com estimulação química do fluxo salivar) de acordo com suas origens.

Ao analisar as proteínas de acordo com suas Interações Moleculares (Figura 4 A, B, C) ou Funções na Película Adquirida, pôde-se segregá-las em quatro principais grupos. O primeiro diz respeito às proteínas que potencialmente têm habilidade de se ligar a cálcio e fosfato. Alguns exemplos incluem proteínas de origem citoplasmática (como a calmodulina) e também as proteínas secretadas pelas glândulas salivares (como a estaterina e a histatina 1). O esmalte dentário é

composto majoritariamente por cristais de hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), o que permite que estas proteínas interajam diretamente com sua superfície através de ligações aos íons cálcio e fosfato. Por conseguinte, formando a camada primária da AEP (adsorção seletiva), estas proteínas podem ser consideradas precursoras da película. Porcentagens similares deste grupo de proteínas foram identificadas em todos os Grupos de Estudo (Tabela 4).

Tabela 4 - Interações Moleculares de cada Grupo (G1 - grupo controle/ sem estimulação do fluxo salivar; G2 – grupo com estimulação mecânica do fluxo salivar; G3 – grupo com estimulação química do fluxo salivar) comparadas em Porcentagem.

	Interações Moleculares		
	G1	G2	G3
Proteína/Proteína	42%	47%	40%
Ligação Ca/PO₄	13%	14%	11%
Desconhecida	16%	12%	20%
Outras	29%	27%	29%

O segundo grupo diz respeito às proteínas que podem interagir com outras proteínas. Proteínas deste grupo podem potencialmente formar as camadas sucessoras de proteínas na AEP através da interação com as proteínas precursoras adsorvidas à superfície do esmalte (camada primária). Um exemplo de proteína que se inclui neste grupo é a MUC5A, conhecida por formar complexos com diversas outras proteínas salivares, como a amilase. Ambas foram identificadas nos três Grupos de Estudo. O Grupo 2 apresentou aproximadamente 47% de suas proteínas com esta capacidade. Já os Grupos 1 e 3, apresentaram valores próximos a 42% e 40%, respectivamente.

O terceiro grupo consiste de proteínas que possuem interações moleculares desconhecidas. A quantidade de proteínas identificadas nos Grupos 1, 2 e 3 com interações desconhecidas foi de 16%, 12% e 20% respectivamente. Vale ressaltar que estes valores (apesar de mais elevado no Grupo 3) são significativamente menores que o valor relatado em literatura prévia (SIQUEIRA et al., 2007), que se aproximava aos 39%. Isto se deve aos avanços no campo da proteômica nos últimos anos e nas crescentes informações dos bancos de dados de proteínas,

diminuindo os déficits no conhecimento e melhorando o entendimento sobre as proteínas e como elas interagem e se comportam em seu ambiente fisiológico. No entanto, em um recente estudo da AEP formada sobre dentes decíduos (ZIMMERMAN et al., 2012), a quantidade de proteínas com interações desconhecidas relatada foi ainda menor, sendo aproximadamente 9%. Provavelmente a diferença de substrato e de voluntários seja uma possível explicação para esta diferença de resultados.

O último grupo consiste de proteínas com interações moleculares diferentes das dos grupos anteriores. Como exemplo pode-se citar as proteínas que interagem com DNA, como a histona H2A. É importante salientar que muitas das proteínas identificadas neste trabalho possuem mais de um tipo de interação molecular, como é o caso da Titina (presente nos três Grupos de estudo), que pode se ligar a proteínas, a íons cálcio e também a ácido nucleico.

Figura 4 (A) - Agrupamento de Proteínas identificadas na AEP **Grupo 1** (grupo controle/ sem estimulação do fluxo salivar) de acordo com suas Interações Moleculares.

Figura 4 (B) - Agrupamento de Proteínas identificadas na AEP **Grupo 2** (grupo com estimulação mecânica do fluxo salivar) de acordo com suas Interações Moleculares.

Figura 4 (C) - Agrupamento de Proteínas identificadas na AEP **Grupo 3** (grupo com estimulação química do fluxo salivar) de acordo com suas Interações Moleculares.

Por fim, podem-se analisar as proteínas da AEP de acordo com suas funções (Figura 5 A, B, C). Estas podem ser divididas em: função metabólica, regeneração tecidual, atividade antimicrobiana, resposta imune, lubrificação, biomineralização e desconhecida (Tabela 5). Devido ao complexo e dinâmico ambiente que a cavidade bucal oferece, todas estas funções biológicas são intimamente relacionadas com as funções desempenhadas pela própria película adquirida. Contudo, existe uma sobreposição entre proteínas que estão envolvidas em processos de biomineralização e proteínas que possuem alta afinidade com íons cálcio e fosfato da superfície do esmalte, como a estaterina e as histatinas (SIQUEIRA et al., 2010). Os resultados foram semelhantes para todos os Grupos, sendo que aproximadamente 10% das proteínas totais de cada grupo apresentaram

envolvimento nos processos de Biomineralização. Estes têm grande importância na homeostasia dos tecidos mineralizados, no caso principalmente do esmalte dentário e consequentemente da saúde bucal. Alguns exemplos de proteínas com participação nestes processos são a Estaterina, a Histatina 1 e a Alfa Amilase 1A. Aproximadamente 15% das proteínas exibiram participação na Resposta Imune. Proteínas conhecidas por esta atividade na cavidade oral são as imunoglobulinas, em especial a Ig Alfa. Além disso, algumas proteínas desempenham atividade antimicrobiana, como a Mucina 5AC, a Histatina 3 e a Alfa Amilase. Em conjunto, estas duas funções biológicas executam importantes papéis na defesa do hospedeiro contra patógenos bucais. A função mais desempenhada pelas proteínas da AEP (aproximadamente 30%) neste estudo foi a de Metabolismo. Alguns exemplos de proteínas identificadas com funções Metabólicas são a Cistatina C, Alfa Amilase e Anidrase Carbônica.

Algumas das proteínas encontradas, como a albumina, são conhecidas por terem concentrações variáveis no fluido gengival crevicular e consequentemente na AEP, dependendo do grau de inflamação no periodonto de proteção, inserção e/ou sustentação. Logo, estas proteínas podem ser consideradas biomarcadores cruciais para inflamações bucais tais como gengivite e/ou periodontite.

Tabela 5. Funções de cada Grupo (G1 - grupo controle/ sem estimulação do fluxo salivar; G2 – grupo com estimulação mecânica do fluxo salivar; G3 – grupo com estimulação química do fluxo salivar) comparadas em Porcentagem.

	Função		
	G1	G2	G3
Metabolismo	30%	29%	29%
Regeneração Tecidual	18%	22%	14%
Antimicrobiana	7%	8%	6%
Resposta Imune	16%	14%	14%
Lubrificação	4%	5%	6%
Biomineralização	9%	9%	10%
Desconhecida	18%	13%	19%

Figura 5 (A) - Agrupamento de Proteínas identificadas na AEP **Grupo 1** (grupo controle/ sem estimulação do fluxo salivar) de acordo com suas funções.

Figura 5 (B) - Agrupamento de Proteínas identificadas na AEP **Grupo 2** (grupo com estimulação mecânica do fluxo salivar) de acordo com suas funções.

Figura 5 (C) - Agrupamento de Proteínas identificadas na AEP **Grupo 3** (grupo com estimulação química do fluxo salivar) de acordo com suas funções.

Para as proteínas **específicas de cada Grupo**, foram feitos agrupamentos baseados nos mesmos critérios de caracterização: quanto à origem, Interações moleculares e Funções (Tabela 6).

Tabela 6 – Proteínas específicas para cada Grupo e suas classificações (G1 - grupo controle/ sem estimulação do fluxo salivar; G2 – grupo com estimulação mecânica do fluxo salivar; G3 – grupo com estimulação química do fluxo salivar)

	Nº de acesso	Nome da proteína
Proteínas presentes Apenas no Grupo 1	H7C4X9	Protein kinase C-binding protein 1 ^{Deleted}
	A5D903	PRB1 protein ^{a, d, e, h, m}
Proteínas presentes Apenas no Grupo 1	P01024	Complement C3 ^{d, h, m}
	P04406	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase ^{a, c, j, l}
	P10161	Basic salivary proline-rich protein 4 allele M (Fragment) ^{a, d, h, o}
	P30740	Leukocyte elastase inhibitor ^{a, b, k, h}
	Q14568	Putative heat shock protein HSP 90-alpha A2 ^{b, k, r}
	Q75T53	Putative uncharacterized protein ^{g, i, r}
	Q96DR5	Short palate, lung and nasal epithelium carcinoma-associated protein 2 ^{a, b, c, e, h, i, l}
	A1A4E9	Keratin 13 ^{a, d, e, h, m}
Proteínas presentes Apenas no Grupo 2	B4DRW1	highly similar to Keratin, type II cytoskeletal 4 ^{d, h, m}
	O60744	Thioredoxin delta 3 (Fragment) ^{a, b, c, e, h, l, m, o}
	P02533	Keratin, type I cytoskeletal 14 ^{d, h, m}
	P04083	Annexin A1 ^{a, c, j, l}
	P08779	Keratin, type I cytoskeletal 16 ^{b, h}
	P12273	Prolactin-inducible protein ^{c, h, n, q}
	P29508	Serpin B3 ^{b, k, h}
	P31025	Lipocalin-1 ^{a, b, c, h, l, m}
	Q06830	Peroxiredoxin-1 ^{g, j, r}
	Q6IBG5	MYL6 protein ^{g, j, r}

**Proteínas presentes
Apenas no Grupo 3**

B7WNW7	HEAT repeat-containing protein 3 ^{j, r}
P01834	Ig kappa chain C region ^{b, f, h, j, o}
P01871	Ig mu chain C region ^{b, f, h, j, o}
P09211	Glutathione S-transferase P ^{a, c, e, h, k, o}
P23284	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B ^{e, h, k}
P25311	Zinc-alpha-2-glycoprotein ^{b, h, k, l}
P35527	Keratin, type I cytoskeletal 9 ^{d, h, l, m}
P54108	Cysteine-rich secretory protein 3 ^{b, e, k, o}
Q9HCY8	Protein S100-A14 ^{a, b, h, i, l}

Foi feita também a caracterização das proteínas específicas para cada Grupo separadamente. Os três parâmetros analisados diferiram notavelmente em todos os grupos (Figura 6 A, B, C).

Figura 6 (A) - Origem das proteínas específicas identificadas no Grupo 1 (grupo controle/ sem estimulação do fluxo salivar).

Figura 6 (B) - Origem das proteínas específicas identificadas no Grupo 2 (grupo com estimulação mecânica do fluxo salivar).

Figura 6 (C) - Origem das proteínas específicas identificadas no Grupo 3 (grupo com estimulação química do fluxo salivar).

A origem das proteínas específicas identificadas no Grupo 1 é em sua maioria Citoplasmática (34%), extracelular (20%) e no Citoesqueleto (20%). Já no Grupo 2, grande parte destas proteínas são de origem Extracelular (25%) e Nuclear (25%), seguidas pela origem Citoplasmática (19%). No Grupo 3, as proteínas de origem Extracelular foram dominantes (36%), seguidas das proteínas com origem nas Organelas (22%). Ainda neste Grupo observaram-se proteínas com origem na Membrana celular (14%), que por sua vez não foram identificadas nos outros Grupos de Estudo.

A grande porcentagem de proteínas com origem extracelular nos Grupos 2 e 3 pode ser explicada em função do próprio estímulo salivar. Sabe-se que a AEP é formada pela adsorção seletiva de proteínas salivares e seus produtos à superfície

do esmalte. Uma vez que diversas proteínas que compõem a película são secretadas pelas glândulas salivares (maiores e menores), pode-se inferir à estimulação salivar a grande porcentagem de proteínas específicas com esta origem. No Grupo 3, as proteínas específicas com origem extracelular foram a maioria, entretanto, neste grupo observaram-se mais proteínas com origem em organelas que citoplasmática, fato que difere dos outros Grupos de Estudo e das análises gerais.

As interações Moleculares que predominaram em todos os Grupos foram as Ligações entre Proteínas, sabidamente importantes para a formação das camadas sucessivas à camada primária da AEP (Figura 7 A, B, C).

Figura 7 (A) - Interações Moleculares exercidas pelas proteínas específicas identificadas no **Grupo 1** (grupo controle/ sem estimulação do fluxo salivar).

Figura 7 (B) - Interações Moleculares exercidas pelas proteínas específicas identificadas no **Grupo 2** (grupo com estimulação mecânica do fluxo salivar).

Figura 7 (C) - Interações Moleculares exercidas pelas proteínas específicas identificadas no **Grupo 3** (grupo com estimulação química do fluxo salivar)

Interessantemente, o Grupo que apresentou maior quantidade de proteínas que fazem ligação com íons Cálcio e Fosfato foi o Grupo 1, fato que poderia ser esperado nos Grupos com Estímulo do fluxo salivar.

64% das proteínas específicas do Grupo 2 apresentaram habilidade em se ligar a outras proteínas. Uma porcentagem considerável de proteínas com interações moleculares desconhecidas (27%). Em contrapartida, nenhuma destas proteínas apresentou capacidade de interagir com íons Cálcio e Fosfato.

No Grupo 3, além da grande porcentagem de proteínas com interações proteína-proteína, foram observadas porcentagens consideráveis de proteínas com interações moleculares desconhecidas (27%) e com outros tipos de interações moleculares (20%).

Consideráveis diferenças puderam ser observadas também entre as funções atribuídas às proteínas específicas de cada Grupo (Figura 8 A, B, C).

Figura 8 (A) - Funções biológicas exercidas pelas proteínas específicas identificadas no **Grupo 1** (grupo controle/ sem estimulação do fluxo salivar).

Figura 8 (B) -Funções biológicas exercidas pelas proteínas específicas identificadas no **Grupo 2** (grupo com estimulação mecânica do fluxo salivar).

Figura 8 (C). Funções biológicas exercidas pelas proteínas específicas identificadas no **Grupo 3** (grupo com estimulação química do fluxo salivar).

Tanto no Grupo 1 quanto no Grupo 2, as funções mais desempenhadas foram: Metabolismo e Regeneração. Além disto, boa parte de suas proteínas desempenham funções ainda desconhecidas. Curiosamente, somente o Grupo 2 apresentou proteínas específicas com atividade antimicrobiana. Contudo, o Grupo 3 apresentou majoritariamente proteínas específicas capazes de participar da Resposta Imune (45%). Uma hipótese a ser considerada é a de que sob condições ácidas (baixo pH), a ligação forte entre proteínas aniônicas da AEP e a HA é enfraquecida, uma vez que o pKa de aminoácidos ácidos é de aproximadamente 4,0. Apesar do constante tamponamento promovido pela saliva, neste estudo (G3) os voluntários enfrentaram queda do pH bucal sucessivo (a cada minuto) por 120 minutos. Tal fato pode ter alterado a formação da camada primária da AEP, modificando também suas camadas seguintes.

Sabe-se que alterações nos níveis plasmáticos de imunoglobulinas podem ser indícios de algumas afecções graves. Entretanto, o mesmo não pode ser concluído a partir deste estudo. A identificação de maior número de proteínas específicas que participam de alguma forma da Resposta Imune pode ter ocorrido em função da intensidade e frequência com que o estímulo ácido foi aplicado. O ácido cítrico a 2% (p/v), como já dito, foi aplicado a cada 60 segundos em ambas as bordas laterais da língua (50 uL em cada borda). Ou seja, pode-se presumir que este estímulo foi em certo grau nocivo para as células da mucosa ou da língua, fazendo com que houvesse a produção de imunoglobulinas e secreção de proteínas que participam nos processos imunes/inflamatórios.

Considerando o perfil protéico total de cada Grupo, em geral as Funções desempenhadas por suas proteínas são equilibradamente semelhantes. Sendo que o Grupo 3, ainda assim, apresenta valores ligeiramente maiores para as funções: Resposta Imune, Antimicrobiana, Lubrificação e funções ainda desconhecidas. Em função da grande semelhança entre os perfis protéicos das AEP analisados e ao grande número de proteínas comuns a todos os três Grupos, foi realizada a quantificação destas.

Utilizando abordagem *label-free* na análise proteômica, os Grupos nos quais a AEP foi formada sob estimulação salivar (Grupos 2 e 3) puderam ser comparados ao

Grupo controle/AEP formada em condição de repouso (Grupo 1). Esta técnica de quantificação permite a quantificação de peptídeos presentes em cada amostra utilizando características espectrais, tais como o tempo de retenção, razão da intensidade de pico (m/z) e por comparação da intensidade do sinal de espectrometria de massa diretamente para um determinado peptídeo (diferencial de Espectrometria de Massa, DSM), ou por contagem do número de aquisição de espectros de massa em tandem correspondentes a um peptídeo específico como um indicador para a sua abundância numa dada amostra (Contagem espectral, SC). A Espectrometria de Massa Diferencial é baseada em comparações entre os picos cromatográficos das medições de íons precursores de peptídeos (pertencentes a uma determinada proteína) extraídos a partir de uma corrida de LC-MS/MS (BONDARENKO et. al., 2002; WANG et al., 2003).

No presente estudo, após identificar e caracterizar o proteoma da AEP em todos os Grupos, foi utilizada a tecnologia SIEVE para comparar os perfis protéicos de cada Grupo. Resumidamente, o SIEVE é um *software* de expressão de espectrometria *label-free* diferencial, que alinha os espectros de MS obtidos de diferentes condições experimentais (Estímulo salivar e Repouso) em função do tempo, determinando a partir dos dados (m/z e o tempo de retenção) as características que diferem entre as condições em estudo. O primeiro passo na análise proteômica quantitativa SIEVE é promover o Alinhamento de todos os cromatogramas a serem comparados. No caso, os 9 cromatogramas gerados pelas três corridas realizadas para cada Grupo foram alinhados. Um dos cromatogramas é então salvo como Cromatograma Padrão, com o qual serão feitas as comparações. Neste estudo, o Cromatograma Padrão foi selecionado a partir do Grupo 1 (Grupo controle/Sem Estimulação do fluxo Salivar). Ou seja, os Grupos 2 (Estimulação Mecânica do fluxo salivar) e 3 (Estimulação Química do fluxo salivar) foram comparados com o Grupo Controle.

A quantificação relativa foi realizada nas 51 proteínas que foram identificadas em todos os três Grupos. A maioria das proteínas apresentou maiores concentrações nos Grupos 2 e 3 (Relação > 1,25 e valor de $p < 0,05$). No Grupo 2, apenas 3 proteínas apresentaram valores inferiores aos do Grupo 1 (Relação < 0,75). Entretanto nestes casos o valor de p não foi significativo. O mesmo ocorreu no Grupo 3, onde apenas 3 proteínas apresentaram valores inferiores aos do Grupo 1. Destas, apenas uma (2%) apresentou valor de p significativo: a Cistatina C (Tabela

7). A cistatina C é uma proteína inibidora de proteases, que também participa na defesa do hospedeiro contra microorganismos, e é também um biomarcador para doença periodontal (HENSSENS et al., 1994). Esta foi a única proteína a aparecer em menor quantidade no Grupo 3. Entretanto, foram identificadas neste Grupo proteínas específicas que desempenham (em sua maioria) funções protetoras, suprimindo possivelmente esta carência.

A importância destas observações diz respeito às funções desempenhadas por estas proteínas. Como por exemplo, a estaterina. A estaterina é uma proteína salivar de baixo peso molecular com cargas negativas que contém resíduos de fosfoserina proporcionais nas posições 2 e 3. É a única proteína salivar que inibe tanto a precipitação primária/inicial de fosfato de cálcio (precipitação espontânea) quanto a precipitação secundária de fosfato de cálcio (Crescimento de cristais), funções cruciais relacionadas com o controle da formação de cálculos dentários e a remineralização de lesões de cárie iniciais (OPPENHEIM et al., 2007).

Além disso, foi demonstrado que a estaterina facilita a ligação de *Actinomyces viscosus* (CLARK et al., 1986) e *Fusobacterium nucleatum* (XIE et al., 1991) à superfície de HA, indicando que esta proteína é determinante na colonização bacteriana inicial da superfície dentária.

A histatina é uma proteína salivar que exibe as mais variadas funções até a presente data, tais como tamponamento, modulação de formação mineral e fortes atividades antifúngica e antibacteriana. Além disso, uma nova característica foi recentemente identificada nas histatinas: proteção do esmalte contra ataques ácidos, uma vez aderida a este. (SIQUEIRA et al, 2010).

Recentes descobertas mostraram que na AEP formada *in vivo*, existe um número significativo de histatinas (Histatina 1, Histatina 3 e Histatina 5) que permanecem intactas. Tal fato sugere que estas proteínas, uma vez intactas e ligadas à superfície do esmalte possuem uma significativa ação contra degradação proteolítica (MCDONALD et al., 2011).

A anidrase carbônica é uma proteína com atividade enzimática com importante papel no controle de pH, podendo catalisar reações entre dióxido de carbono e água, transportar íons bicarbonato e zinco (LINDSKOG et al., 1997).

As mucinas apresentam alto peso molecular e se caracterizam por formar géis, no caso, conferindo à saliva sua consistência viscoelástica. Podem possuir

atividade antimicrobiana em função de englobarem alguns microorganismos, impedindo sua ação contra o hospedeiro.

Todas estas se apresentam aumentadas nos Grupos 2 e 3 quando comparadas ao Grupo controle (1). Pode-se constatar ainda que o Grupo 3 apresenta em geral concentrações maiores de proteínas se comparado ao Grupo 2 (Tabela 8).

Tabela 7 – Quantificação (SIEVE) das proteínas presentes nos três Grupos de estudo. G1 - grupo controle/ sem estimulação do fluxo salivar; G2 – grupo com estimulação mecânica do fluxo salivar; G3 – grupo com estimulação química do fluxo salivar)

Nº Acesso	Descrição	Ratio G2/G1	Valor de p	Ratio G3/G1	Valor de p
A7Y9J9	Mucin 5AC, oligomeric mucus/gel-forming highly similar to Homo sapiens keratin 13	1,70	0,000	1,46	0,014
A8K2H9	(KRT13), transcript variant 1, mRNA	1,76	0,051	1,92	0,006
Nº Acesso	Descrição	Ratio G2/G1	Valor de p	Ratio G3/G1	Valor de p
A8K2U0	Alpha-2-macroglobulin-like protein 1	1,44	0,041	2,28	0,012
B1AN48	Small proline-rich protein 3	1,88	0,002	2,21	0,037
B4DGT4	highly similar to Histone deacetylase 5	1,54	0,010	1,58	0,002
B4DPR2	highly similar to Serum albumin	1,82	0,000	2,36	0,044
B4DZ16	cDNA FLJ58649	1,58	0,041	1,77	0,006
B4E1T1	highly similar to Keratin, type II cytoskeletal 5	1,87	0,000	1,77	0,021
B5ME49	Mucin-16	1,58	0,000	1,89	0,001
B7Z5K0	highly similar to Homo sapiens membrane-associated ring finger (C3HC4) 7 (MARCH7), mRNA	1,52	0,000	1,42	0,000
B7ZMD7	Amylase, alpha 1A (Salivary)	1,63	0,059	1,13	0,511
B8ZZJ3	Alstrom syndrome protein 1	1,41	0,028	1,54	0,001
C9JA77	X	1,06	0,985	1,92	0,006
E7EMQ1	Carbonic anhydrase 6	2,10	0,000	2,55	0,023
E7EQT2	Mucin-4 beta chain	1,51	0,004	1,61	0,064
E7ESM2	Urokinase-type plasminogen activator chain B	1,52	0,030	1,88	0,089
E7ETI5	G-protein-coupled receptor 98	1,49	0,048	1,73	0,009
F4MHJ1	Ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat protein Y-linked transcript variant 97	1,36	0,066	1,87	0,003
F6KPG5	Albumin (Fragment)	1,52	0,157	1,66	0,046
G3CIG0	MUC19 variant 12	1,43	0,125	2,29	0,003
H0Y930	Extracellular matrix protein FRAS1	1,63	0,018	2,52	0,056
H6VRF8	Keratin 1	1,68	0,072	1,63	0,021
H7BXM7	X	1,49	0,017	1,64	0,076

H7BYJ0	Mucin-4	1,97	0,004	2,48	0,019
O15079	Syntaphilin	1,72	0,001	1,58	0,013
P01034	Cystatin-C	1,64	0,000	0,72	0,033
P01036	Cystatin-S	0,86	0,303	2,37	0,050
P01037	Cystatin-SN	1,91	0,055	2,27	0,015
P01833	Polymeric-immunoglobulin receptor	1,76	0,051	2,06	0,017
P01877	Ig alpha-2 chain C region	1,36	0,066	1,42	0,157
P02808	Statherin	1,29	0,121	1,39	0,058
P02810	Salivary acidic proline-rich phosphoprotein 1/2	1,61	0,000	1,93	0,013
P02812	Basic salivary proline-rich protein 2 (Fragment)	1,42	0,081	1,94	0,015
P04080	Cystatin-B	1,45	0,003	1,67	0,065
P02814	Submaxillary gland androgen-regulated protein 3B	1,49	0,001	1,96	0,024
P04080	Cystatin-B	1,45	0,003	1,67	0,065
P06733	Alpha-enolase	1,30	0,000	1,72	0,003
P07737	Profilin-1	1,46	0,056	1,99	0,009
P09228	Cystatin-SA	1,27	0,372	1,66	0,026
Nº Acesso	Descrição	Ratio G2/G1	Valor de p	Ratio G3/G1	Valor de p
P0CG05	Ig lambda-2 chain C regions	1,71	0,018	2,18	0,039
P15515	Histatin-1	1,24	0,179	1,13	0,468
P15516	Histatin-3	1,44	0,017	1,64	0,024
P19961	Alpha-amylase 2B	1,80	0,010	1,48	0,005
P28325	Cystatin-D	2,01	0,008	1,58	0,083
P35908	Keratin, type II cytoskeletal 2 epiderma	1,53	0,000	1,02	0,147
P54652	Heat shock 70 kDa protein 2	1,67	0,001	1,80	0,051
Q8TAX7	Mucin-7	1,86	0,004	1,30	0,227
Q8WVD6	PHTF2 protein	1,73	0,000	1,54	0,004
Q8WZ42	Titin	2,02	0,043	1,92	0,035
Q9HC84	Mucin-5B	1,18	0,252	1,84	0,000
Q9NR09	Baculoviral IAP repeat-containing protein 6	1,63	0,004	1,58	0,032
Q9NV58	E3 ubiquitin-protein ligase RNF19A	1,53	0,083	1,58	0,055

Durante a realização da quantificação proteica prévia às análises proteômicas, os Grupos 2 e 3 apresentaram maior concentração de proteínas que o Grupo 1. Tais resultados foram confirmados após a quantificação *label-free* SIEVE, onde foi constatado que 64% das proteínas analisadas se apresentaram aumentadas no Grupo 2 em relação ao Grupo 1 (Controle) e 74% das proteínas analisadas se apresentaram aumentadas no Grupo 3 em relação ao Grupo 1.

Em geral, o Grupo 1 apresentou maior diversidade protéica que os outros Grupos em estudo. Em contrapartida, como já visto, a concentração de proteínas nos Grupos 2 e 3 foi maior que no Grupo 1.

As diferenças encontradas entre os Grupos são possivelmente decorrentes das alterações na expressão protéica na saliva estimulada. Ou seja, as mudanças ocorridas na composição salivar durante a estimulação do fluxo são provavelmente determinantes das mudanças ocorridas na composição final da AEP.

Os resultados sugerem a hipótese de que o fluxo salivar estimulado mecanicamente (Grupo 2), promove a produção de saliva com caráter mais digestivo, enquanto o fluxo salivar estimulado quimicamente por ácido (Grupo 3) promove a produção de saliva com caráter mais protetor. Isto culminaria na alteração da composição da película adquirida durante sua formação, como foi observado.

Em adição, como observado na quantificação, a estimulação salivar química resulta na formação de AEP com maior concentração de proteínas, o que reforça o seu caráter protetor do esmalte contra ataques ácidos. Sendo assim, um protocolo de estimulação salivar química poderia se tornar uma alternativa válida para pacientes com hipossalivação e alto risco de cárie e/ou erosão dentária. São necessários, no entanto, mais estudos para se validar esta hipótese.

Entender a composição e a estrutura da AEP formada sob diferentes condições salivares fornece um novo direcionamento em relação a doenças bucais como a cárie e a erosão dentária.

As proteínas identificadas até o momento sugerem que a estimulação salivar, tanto mecânica quanto química, é capaz de conferir à película adquirida diferentes perfis protéicos, no caso, mais ricos e potencialmente mais protetores. Contudo, deve-se analisar com mais profundidade os achados deste estudo para que se possam fazer conclusões mais específicas sobre as alterações protéicas observadas e como estas ocorrem.

Sendo assim, o presente trabalho abre novas fronteiras para o estudo sobre interferência e modulação do fluxo salivar na formação da AEP, visando à obtenção de aumento da qualidade e quantidade de proteínas com caráter protetor que a compõem.

CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

Foram identificadas 101 proteínas no grupo sem estimulação salivar (controle), 89 no grupo com estimulação mecânica do fluxo salivar e 75 no grupo com estimulação salivar química. Cinquenta e uma proteínas foram comuns aos 3 grupos, sendo que a concentração destas foi maior nos grupos 2 e 3.

A quantificação proteica livre de marcadores revelou que a estimulação do fluxo salivar, tanto mecânica quanto química, promove a formação de película adquirida com maior concentração de proteínas protetoras, como anidrase carbônica, mucinas, cistatinas e imunoglobulinas.

Este estudo foi o primeiro a explorar e correlacionar as diferentes condições de estimulação do fluxo salivar com a formação da AEP, e também o primeiro estudo a utilizar análise proteômica quantitativa livre de marcadores (*Label-free*) para este fim.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AEBERSOLD R., MANN M. (2003) "Mass spectrometry-based proteomics." *Nature*. Mar 13;422(6928):198-207.

AINÉ, L., et al., (1993). "Dental erosions caused by gastroesophageal reflux disease in children." *ASDC J Dent Child* 60(3): 210-4.

AMAECHI, B. T., et al., (1999). "Thickness of acquired salivary pellicle as a determinant of the sites of dental erosion." *J Dent Res* 78(12): 1821-8.

ATTIN, T., et al., (1998). "Brushing abrasion of eroded dentin after application of sodium fluoride solutions." *Caries Res* 32(5): 344-50.

BALCERZAK M, et al., (2008) "Proteome analysis of matrix vesicles isolated from femurs of chicken embryo." *Proteomics*. Jan;8(1): 192-205.

BANTSCHEFF M., et al., (2007) "Quantitative mass spectrometry in proteomics: a critical review." *Anal Bioanal Chem*. Oct; 389(4):1017-31.

BECKER C. H., BERN M., (2011) "Recent developments in quantitative proteomics." *Mutat Res*. Jun 17;722(2):171-82.

BENNICK, A. (1975) "Chemical and physical characteristics of a phosphoprotein from human parotid saliva." *Biochem. J.* (1975) 145 (557-0) (Printed in Great Britain)

BONDARENKO, P. V. et al., (2002) "Identification and relative quantitation of protein mixtures by enzymatic digestion followed by capillary reversedphase liquid chromatography-tandem mass spectrometry." *Anal. Chem.* 74, 4741-4749.

BURLAGE, F. R., et al., (2005). "Variability of flow rate when collecting stimulated human parotid saliva." *Eur J Oral Sci* 113(5): 386-90.

BUZALAF, M. A. R., HANNAS, A. R., KATO, M. T. (2012). "Saliva and dental erosion." *Journal of Applied Oral Science* (Impresso), v. 20, p. 493-502.

CANDIANO G., et al. (2004) "Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis." *Electrophoresis*. May; 25(9): 1327-33.

CARGILE B. J., et al., (2005) "Immobilized pH gradient isoelectric focusing as a first-dimension separation in shotgun proteomics." *J Biomol Tech*. Sep; 16(3):181-9.

CARPENTER, G. H. (2013). " The secretion, components, and properties of saliva. *Annu. Rev. Food Sci. Technol*. 4:267–76.

CASTLE, D., CASTLE, A., (1998). "Intracellular transport and secretion of salivary proteins. *Crit. Rev. Oral Biol. Med*. 9(1): 4–22

CHELIUS D., BONDARENKO P. V., (2002) "Quantitative profiling of proteins in complex mixtures using liquid chromatography and mass spectrometry." *J Proteome Res*. Jul-Aug;1(4): 317-23.

CHEN E. I., YATES J. R., (2007) "Cancer proteomics by quantitative shotgun proteomics." *Mol Oncol*. Sep; 1(2): 144-59.

CHEN J., et al., (2002) "Integration of capillary isoelectric focusing with capillary reversed-phase liquid chromatography for two-dimensional proteomics separation." *Electrophoresis*. Sep; 23(18): 3143-8.

CLAESSENS H. A., VAN STRATEN M. A., (2004) "Review on the chemical and thermal stability of stationary phases for reversed-phase liquid chromatography." *J Chromatogr A*. Dec 10; 1060(1- 2):23-41.

CLARK, W. B., (1986). "Actinomyces Adsorption Mediated by Type-1 Fimbriae." *J Dent Res* vol. 65 no. 91166-1168.

COLUCCI-D'AMATO L., et al., (2011) "Quantitative neuroproteomics: classical and novel tools for studying neural differentiation and function." *Stem Cell Rev*. Mar;7(1): 77-93.

DA MATA, A. D., et al., (2009). "Effects of gustatory stimulants of salivary secretion on salivary pH and flow: a randomized controlled trial." *Oral Dis* 15(3): 220-8.

DARLING, A. I. (1956) Br. Dent. J. 101,329-341

DASS, C. (2007) "Fundamentals of contemporary mass spectrometry." Hoboken, Wiley-Interscience.

DAWES, C. (2004). "Factors influencing salivary flow rate and composition." Saliva and oral health.

DAWES, C. (2003a). "Estimates, from salivary analyses, of the turnover time of the oral mucosal epithelium in humans and the number of bacteria in an edentulous mouth." Arch. Oral Biol. 2003, 48, 329–336.

DAWES, C., (2003b). "What Is the Critical pH and Why Does a Tooth Dissolve in Acid?" J Can Dent Assoc 2003; 69(11):722–4

EDGAR, W. M., (1992) "Saliva: its secretion and composition." British Dental Journal 172, 305-312.

DUCKWORTH, R. (2005). "The teeth and their environment. Physical, chemical and biochemical influences." Monographs in Oral Sci,v.20.

EDGAR, M., DAWES, C., and O'MULLANE. Lowestoft, Dennis Barber Limited: 32-49.

ENG J. K., MCCORMACK A. L., YATES J. R., (1994) "3rd. An Approach to Correlate Tandem Mass Spectral Data of Peptides with Amino Acid Sequences in a Protein Database." J Am Soc Mass Spectrom (5):976-89.

FEJERSKOV, O. e KIDD, E. (2005) "Cárie dentária. A doença e seu tratamento clínico." São Paulo: Santos.

FEJERSKOV O. & THYLSTRUP A., (1994). "Different concepts of dental caries and their implications." In: Textbook of clinical cariology. 2nd ed. Thylstrup A, Fejerskov O, editors. Copenhagen: Munksgaard, pp. 259-283.

GHAFOURI, B., et al., (2003). "Mapping of proteins in human saliva using two dimensional gel electrophoresis and peptide mass fingerprinting." *Proteomics* 3(6): 1003-15.

GYURKO C., et al., (2000). "The antimicrobial peptide histatin 5 releases cellular materials from *Candida albicans*." *J Dent Res* 79: 175–175.

GLANTZ, P. O., et al., (1996). "Biochemical and physiological considerations for modeling biofilms in the oral cavity: a review." *Dent Mater* 12(3): 208-14. HALL, A. F., et al., (1999). "The effect of saliva on enamel and dentine erosion." *J Dent* 27(5): 333-9.

GRAVES P. R., & HAYSTEAD T. A. (2002) "Molecular biologist's guide to proteomics." *Microbiol Mol Biol Rev.* Mar; 66(1): 39-63; table of contents.

HANNING, C., et al., (2007). "Protective effect of the in situ pellicle on dentin erosion - an ex vivo pilot study." *Arch Oral Biol* 52(5): 444-9.

HANNIG, C., et al., (2005a). "Erosive effects of different acids on bovine enamel: release of calcium and phosphate in vitro." *Arch Oral Biol* 50(6): 541-52.

HANNING, C., et al., (2005b). "Enzymes in the acquired enamel pellicle." *Eur J Oral Sci* 113(1): 2-13.

HANNING, M., BALZ, M. (1999). "Influence of in vivo formed salivary pellicle on enamel erosion." *Caries Res* 33(5): 372-9.

HANNING, M., BALZ, M. (2001). "Protective properties of salivary pellicles from two different intraoral sites on enamel erosion." *Caries Res* 35(2): 142-8.

HANNIG, M., et al., (2004). "Protective effect of the in situ formed short-term salivary pellicle." *Arch Oral Biol* 49(11): 903-10.

HANNIG, M., et al. (2003). "Influence of salivary pellicle formation time on enamel demineralization--an in situ pilot study." *Clin Oral Investig* 7(3): 158-61.

HANNING, M., JOINER, A. (2006). The structure, function and properties of the acquired pellicle. The teeth and their environment physical, chemical and biochemical influences. R. M. Duckworth. Basel, Karger. 19: 154.

HARA, A. T., et al., (2006). "Protective effect of the dental pellicle against erosive challenges in situ." *J Dent Res* 85(7): 612-6.

HAY, D.I., et al., (1988). "The primary structures of six human salivary acidic proline-rich proteins (PRP-1, PRP-2, PRP-3, PRP-4, PIF-s and PIF-f)." *Biochem. J.*, 255, 15-21.

HAY, D. I. (1973). "The interaction of human parotid salivary proteins with hydroxyapatite." *Arch Oral Biol* 18:1517-1529.

HAY, D., I., (1975). "Fractionation of human parotid salivary proteins and the isolation of an histidine-rich acidic peptide which shows high affinity for hydroxyapatite surfaces." *Archives of Oral Biology* 20, Issue 9, p 553-558, IN1-IN2

HEIDENHAIN, R. (1883). "Physiologie der Absonderungsvorgänge: In Handbuch der Physiologie", ed. HERMANN. Leipzig: Vogel.

HENSKENS Y. M., et al., (1994). "Cystatins S and C in human whole saliva and in glandular salivas in periodontal health and disease." *J Dent Res*. 1994 Oct; 73(10):1606-14.

HODSON N. A., LINDEN R. W. A., (2006) "The effect of monosodium glutamate on parotid salivary flow in comparison to the response to representatives of the other four basic tastes." *Physiol. Behav.* 89(5): 711-17

HOFFMANN, E., & STROOBANT, V., (2007) "Mass spectrometry principles and applications." Chichester, Wiley-Interscience.

IMFELD, T. (1996). "Dental erosion. Definition, classification and links." *Eur J Oral Sci* 104(2 (Pt 2)): 151-5.

JENKINS, G. N. (1978). "The physiology and biochemistry of the mouth." Toronto: Blackwell

JIANG X., et al., (2007) "Method development of efficient protein extraction in bone tissue for proteome analysis." *J Proteome Res.* Jun; 6(6):2287-94.

JURIAANSE, A. C. (1979). "Proceedings Dental Plaque and Surface Interactions in the Oral Cavity" (Leach, S.A., ed) pp. 313-329, Information Retrieval, London

KARAS, M., et al., (1987). "Matrix-assisted ultraviolet laser desorption of non-volatile compounds." *Int. J. Mass Spectrom.* 78: 53-68.

KONOPKA K., et al., (2010). "Susceptibility of *Candida* biofilms to histatin 5 and fluconazole." *Antonie Van Leeuwenhoek* 97: 413–417.

LAMKIN M. S., et al., (1991). "Salivary cystatin SA-III, a potential precursor of the acquired enamel pellicle, is phosphorylated at both its amino- and carboxyl-terminal regions". *Archives of Biochemistry and Biophysics*. Vol 288, Issue 2, 1, Pages 664–670.

LARSEN, M. J., (1990). "Chemical events during tooth dissolution." *J Dent Res.* Feb;69 Spec No:575-80; discussion 634-6.

LENDENMANN, U., et al., (2000). "Saliva and dental pellicle - a review." *Adv Dent Res* 14: 22-8.

LILLEY K. S., FRIEDMAN D. B., (2004) "All about DIGE: quantification technology for differential-display 2D-gel proteomics." *Expert Rev Proteomics*. Dec;1(4):401-9.

LINK A. J., et al., (1999) "Direct analysis of protein complexes using mass spectrometry." *Nat Biotechnol.* Jul; 17(7):676-82.

LINNETT, V. and SEOW, W. K. (2001). "Dental erosion in children: a literature review." *Pediatr Dent* 23(1): 37-43.

LINDSAY, S. & KEALEY, D., (1987). "High performance liquid chromatography." John Wiley and Sons, New York, NY.

LIPPERT, F., et al., (2011) "Enamel Demineralization and Remineralization under Plaque Fluid-Like Conditions: A Quantitative Light-Induced Fluorescence Study." *Caries Res* 2011; 45:155–161.

LINDSKOG S. (1997). "Structure and mechanism of carbonic anhydrase." *PHARMACOLOGY & THERAPEUTICS*. 74:1-20.

LUSSI, A. (1996). "Dental erosion clinical diagnosis and case history taking." *Eur J Oral Sci* 104(2 (Pt 2)): 191-8.

MAGALHAES, A. C., et al., (2009). "Insights into preventive measures for dental erosion." *J Appl Oral Sci* 17(2): 75-86. MAYHALL, C. W. et al., (1970) "Concerning the composition and source of the acquired enamel pellicle of human teeth." *Arch. Oral Biol.* 15, 1327-1341.

MANN, M., et al., (1993). "Use of mass spectrometric molecular weight information to identify proteins in sequence databases." *Biol Mass Spectrom* 22(6): 338-45.

MASSON, N., et al., (2013). "APF application changes the protein composition of human acquired enamel pellicle." *Caries Research*, v. 47, p. 251-258.

MATSUO R. (2000). "Role of saliva in the maintenance of taste sensitivity." *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 11(2):216–29.

MEGA J., et al., 1992. Cytokine- and Ig-producing T cells in mucosal effector tissues: analysis of IL-5- and IFN-gamma-producing T cells, T cell receptor expression, and IgA plasma-cells from mouse salivary gland-associated tissues. *J. Immunol.* 148(7):2030–39.

MEURMAN, J. H., TEN CATE, J. M. (1996). "Pathogenesis and modifying factors of dental erosion." *Eur J Oral Sci* 104(2 (Pt 2)): 199-206.

MISTRY, M., GRENBY T. H. (1993). "Erosion by soft drinks of rat molar teeth assessed by digital image analysis." *Caries Res* 27(1): 21-5.

MORENO, E.C., et al., (1979). "Effect of human salivary proteins on the precipitation kinetics of calcium phosphate." *Calcif. Tissue Int.* 1979, 28, 7–16.

MORRISON R. T., et al, (1992). "Organic Chemistry" 6th edition Benjamin Cummings.

MOSS, S. J. (1998). "Dental erosion." *Int Dent J* 48(6): 529-39.

MOTOYAMA A., YATES J. R., (2008) "3rd. Multidimensional LC separations in shotgun proteomics." *Anal Chem.* Oct 1;80(19):7187-93.

NEYRAUD, E., et al., (2006). "Proteomic analysis of human whole and parotid salivas following stimulation by different tastes." *J Proteome Res* 5(9): 2474-80.

NIKIFORUK G., (1985). "Understanding the dental carie." New York: Karger.

NUNN, J. H. (1996). "Prevalence of dental erosion and the implications for oral health." *Eur J Oral Sci* 104(2 (Pt 2)): 156-61.

OPITECK G. J., JORGENSON J. W., (1997) "Two-dimensional SEC/RPLC coupled to mass spectrometry for the analysis of peptides." *Anal Chem.* Jul 1; 69(13):2283-91.

OPPENHEIM, F. G. & HELMERHORST E., J., (2007), "Saliva: a Dynamic Proteome." *J Dent Res* August 2007 vol. 86 no. 8 680-693.

OPPENHEIM, F. G., et al., (1986). "The Primary Structure and Functional Characterization of the Neutral Histidine-rich Polypeptide from Human Parotid Secretion." *J Biol Chem* Vol. 261, No. 3, pp. 1177-1182.

OPPENHEIM, F. G., et al., (1971). "Proline-rich proteins from human parotid saliva. I. Isolation and partial characterization." *Biochemistry*, 1971, 10 (23), pp 4233–4238.

PANDEY A., MANN M. (2000) "Proteomics to study genes and genomes." *Nature*. Jun 15;405(6788):837-46.

PENG J., GYGI S. P., (2001) "Proteomics: the move to mixtures." *J Mass Spectrom*. Oct;36(10):1083- 91.

PERKINS D. N., et al., (1999) "Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data." *Electrophoresis*. Dec;20(18):3551-67.

PROCTOR G. B., et al., 2005. A statherin and calcium enriched layer at the air interface of human parotid saliva. *Biochem. J.* 389:111–16.

PROCTOR, G. B., et al., (1998). "Secretory protein synthesis and constitutive (vesicular) secretion by salivary glands." In *Glandular Mechanisms of Salivary Secretion*, ed. JR Garrett, J Ekstrom, LC Anderson, pp. 73–88. Basel: Karger.

PUSATERI C. R., et al., (2009). "Sensitivity of *Candida albicans* biofilm cells grown on denture acrylic to antifungal proteins and chlorhexidine." *Arch Oral Biol* 54: 588–594.

ROBINSON C. P. et al., (1997). "Elevated levels of cysteine protease activity in saliva and salivary glands of the nonobese diabetic (NOD) mouse model for Sjögren syndrome." *PNAS* May 27, vol. 94 no. 115767-5771.

SCHEUTZEL, P. (1996). "Etiology of dental erosion--intrinsic factors." *Eur J Oral Sci* 104(2 (Pt 2)): 178-90.

SCHULZE W. X., USADEL B., (2010) "Quantitation in mass-spectrometry-based proteomics." *Annu Rev Plant Biol*; 61:491-516.

SELVIG, K. A., (1972). "The crystal structure of hydroxyapatite in dental enamel as seen with the electron microscope. *J Ultrastruct Res. Nov*; 41(3):369-75.

SHANNON, I.L. (1958). "Sodium and potassium levels of human whole stimulated saliva collected under two forms of stimulation from subjects in a select age group." *J.dent.Res.* 37, 391-400.

SIQUEIRA, W. L., et al., (2012b). "New Insights into the Composition and Functions of the Acquired Enamel Pellicle." *J Dent Res* published online, DOI: 10.1177/0022034512462578.

SIQUEIRA, W. L., et al., (2012a) "Quantitative Proteomic Analysis of the Effect of Fluoride on the Acquired Enamel Pellicle." *PLoS ONE* 7(8): e42204.

SIQUEIRA, W. L. & DAWES C., (2011). "The salivary proteome: Challenges and perspectives." *PROTEOMICS - Clinical Applications* Volume 5, Issue 11-12, pages 575–579.

SIQUEIRA, W. L., et al., (2010). "Evidence of Intact Histatins in the in vivo Acquired Enamel Pellicle." *J Dent Res* 89(6): 626-630.

SIQUEIRA, W. L. & OPPENHEIM, F. G., (2009). "Small Molecular Weight Proteins/Peptides Present in the in vivo formed Human Acquired Enamel Pellicle" *Arch Oral Biol.* 54(5): 437–444.

SIQUEIRA, W. L., et al., (2008). "Proteome of human minor salivary gland secretion." *J Dent Res* 87(5): 445-50.

SIQUEIRA, W. L., et al., (2007). "Identification of protein components in in vivo human acquired enamel pellicle using LC-ESI-MS/MS." *J Proteome Res* 6(6):2152-60.

SKJORLAND, K. K., et al., (1995). "Rate of pellicle formation in vivo" *Acta Odontol Scandinavica*, Vol. 53, No. 6 , Pages 358-362.

SMITH, B. G., J. K. Knight (1984). "An index for measuring the wear of teeth." *Br Dent J* 156(12): 435-8.

SÕNJU, T., ROLLA, G., (1973). "Chemical analys of the acquired pellicle formed in two hours on cleaned human teeth in vivo". *Caries Re.* 7, 30-38.

STIEGER, M. (2012). "Effect of NaCl and sucrose tastants on protein composition of oral fluid analysed by SELDI-TOF-MS." *Arch Oral Biol.* 2012 Sep;57(9):1200-10. doi: 10.1016/j.archoralbio. 2012.04.004. Epub 2012 Apr 26.

TEN CATE, J. M.; T. Imfeld (1996). "Dental erosion, summary." *Eur J Oral Sci* 104(2 (Pt 2)): 241-4.

THIEDE, B., et al., (2005). "Peptide mass fingerprinting." *Methods* 35(3): 237-47.

UNWIN R. D., GRIFFITHS J. R., WHETTON A. D., (2010) "Simultaneous analysis of relative protein expression levels across multiple samples using iTRAQ isobaric tags with 2D nano LC-MS/MS." *Nat Protoc.* Sep; 5(9):1574-82.

VUKOSAVLJEVIC, D., et al., (2012). "The effect of histatin 5, adsorbed on PMMA and hydroxyapatite, on *Candida albicans* colonization." (wileyonlinelibrary.com) DOI: 10.1002/yea.2925.

WANG, W., et al., (2003) "Quantification of proteins and metabolites by mass spectrometry without isotopic labeling or spiked standards." *Anal. Chem.* 75, 4818-4826.

WASHBURN M. P., WOLTERS D., YATES J. R., (2001) "3rd. Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology." *Nat Biotechnol.* Mar;19(3):242-7.

WETTON, S., et al., (2006). "Exposure time of enamel and dentine to saliva for protection against erosion: a study in vitro." *Caries Res* 40(3): 213-7.

WHITE, D. J. (1987). "Reactivity of fluoride dentifrices with artificial caries. I. Effects on early lesions: F uptake, surface hardening and remineralization." *Caries Res* 21(2): 126-40.

WIEGAND, A., et al., (2008). "Impact of the in situ formed salivary pellicle on enamel and dentine erosion induced by different acids." *Acta Odontol Scand* 66(4): 225-30.

WILKINS M. R., et al., (1997). "Proteome Research: New frontiers in functional genomics, principles and practice." Berlin, springer verlag. 243.

WILKINS M. R., et al., (1996). "Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it." *Biotechnol Genet Eng Rev* 13: 19-50.

XIE H., et al., (1991). "Adhesive properties of strains of *Fusobacterium nucleatum* of the subspecies *nucleatum*, *vincentii* and *polymorphum*." *Oral Microbiol Immunol* 6:257-263.

YAO, Y., et al., (2003). "Identification of protein components in human acquired enamel pellicle and whole saliva using novel proteomics approaches." *J Biol Chem* 278(7): 5300-8.

ZALENY, J., (1917). "Instability of electrified liquid surface." *Physical Review* 10(1): 1-6.

ZERO, D. T. (1996). "Etiology of dental erosion--extrinsic factors." *Eur J Oral Sci* 104(2 (Pt 2)): 162-77.

ZHANG H., et al., (2010) "Proteomics in bone research." *Expert Rev Proteomics*. 2010 Feb;7(1):103-11.

ZHU W., SMITH J. W., HUANG C. M. (2010) "Mass spectrometry-based label-free quantitative proteomics." *J Biomed Biotechnol*; 2010:840518.

ZIMMERMAN, J. N., et al., (2013). "Proteome and Peptidome of Human Acquired Enamel Pellicle on Deciduous Teeth" *Int. J. Mol. Sci*, 14, 920-934.

ANEXOS

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Determinação da composição da película adquirida formada sobre esmalte humano in vivo e da sua modificação após estimulação mecânica e química do fluxo salivar: estudo proteômico.

Pesquisador: Flávia Zaidan

Área Temática: Área 8. Pesquisa com cooperação estrangeira.

Versão: 1

CAAE: 10678312.4.0000.5417

Instituição Proponente: Faculdade de Odontologia de Bauru-USP

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 162.893

Data da Relatoria: 28/11/2012

Apresentação do Projeto:

Devido ao papel desempenhado pela saliva na erosão dentária, torna-se importante determinar a composição proteica da saliva estimulada mecanicamente ou quimicamente e sua ação sobre a película adquirida. Para tanto, 9 voluntários, pacientes da FOB-USP, de ambos os gêneros e com idade entre 18 e 35 anos serão convidados a participar da pesquisa. Será realizada uma limpeza profissional dos dentes e eles deverão permanecer 2 horas sem ingerir qualquer alimento. Dependendo do grupo ao qual o voluntário pertence, haverá o estímulo mecânico (mastigação de um pedaço de parafina) ou químico (aplicação de 50mL de solução de ácido cítrico nas laterais da língua) de produção salivar. Após 2 horas, a película adquirida formada será coletada com papel filtro de eletrodos. A película adquirida será analisada no laboratório do Prof. Dr. Walter Siqueira da University of Western Ontario, Canada.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo deste trabalho será comparar o perfil proteico em películas adquiridas formadas in situ sobre o esmalte humano em condições de repouso (grupo 1), bem como analisar o perfil proteico nestas películas após estimulação salivar mecânica (grupo 2) e química (grupo 3).

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não há riscos aos sujeitos da pesquisa. Como benefícios eles terão o exame bucal para determinação de necessidade de tratamento odontológico e serão encaminhados para tratamento nas clínicas da FOB-USP. Também receberão profilaxia dentária e aplicação tópica de Flúor.

Endereço: DOUTOR OCTAVIO PINHEIRO BRISOLLA 75 QUADRA 9

Bairro: VILA NOVA CIDADE UNIVERSITARIA **CEP:** 17.012-901

UF: SP **Município:** BAURU

Telefone: (14)3235-8356

Fax: (14)3235-8356

E-mail: mferrari@fob.usp.br

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de pesquisa envolvendo 9 voluntários, com idade entre 18 e 35 anos, com procedimentos não invasivos para determinação da composição da película adquirida formada na superfície dentária em condições de produção normal e estimulada de saliva. O objetivo é determinar a ação dessa saliva sobre a película adquirida e compreender a sua possível atuação nos casos de erosão dentária. O material coletado será analisado em laboratório no Canadá.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos foram devidamente apresentados. A carta convite do Prof Dr. Walter Siqueira, responsável pelo laboratório no Canadá também está anexada. Demais documentos estão de acordo com as exigências do CEP.

Recomendações:

Não há

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não se aplica

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Sim

Considerações Finais a critério do CEP:

Esse projeto foi considerado APROVADO. O CEP-FOB/USP exige a apresentação de relatórios anuais (parciais e finais), conforme o cronograma apresentado. Qualquer alteração na metodologia e/ou título e a inclusão ou exclusão de autores deverá ser prontamente comunicada. Lembramos que na apresentação do relatório final, deverão ser incluídos todos os TCLEs e/ou termos de doação de dentes devidamente assinados e rubricados.

BAURU, 04 de Dezembro de 2012

Assinador por:
Maria Teresa Atta
(Coordenador)

Endereço: DOUTOR OCTAVIO PINHEIRO BRISOLLA 75 QUADRA 9

Bairro: VILA NOVA CIDADE UNIVERSITARIA **CEP:** 17.012-901

UF: SP **Município:** BAURU

Telefone: (14)3235-8356

Fax: (14)3235-8356

E-mail: mferrari@fob.usp.br

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE BAURU-
USP

Endereço: DOUTOR OCTAVIO PINHEIRO BRISOLLA 75 QUADRA 9
Bairro: VILA NOVA CIDADE UNIVERSITARIA **CEP:** 17.012-901
UF: SP **Município:** BAURU
Telefone: (14)3235-8356 **Fax:** (14)3235-8356 **E-mail:** mferrari@fob.usp.br