



Nádia Masson

“EFEITO DA APLICAÇÃO DE FLÚOR FOSFATO ACIDULADO NA
COMPOSIÇÃO PROTEICA DA PELÍCULA SALIVAR FORMADA SOBRE
ESMALTE”

PIRACICABA
2012



UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE DONTOLOGIA DE PIRACICABA

Nádia Masson

“EFEITO DA APLICAÇÃO DE FLÚOR FOSFATO ACIDULADO NA
COMPOSIÇÃO PROTEICA DA PELÍCULA SALIVAR FORMADA SOBRE
ESMALTE”

Orientadora: Profa. Dra. Adriana Franco Paes Leme

DISSERTAÇÃO APRESENTADA À FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE PIRACICABA, DA UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE CAMPINAS, COMO REQUISITO PARA
OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM ODONTOLOGIA,
ÁREA DE CARIOLOGIA.

Esse exemplar corresponde à versão final da
Dissertação defendida pelo aluno, e orientada
pela Profa. Dra. Adriana Franco Paes Leme.

Adriana Franco Paes Leme

PIRACICABA
2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
JOSIDELMA F COSTA DE SOUZA – CRB8/5894 - BIBLIOTECA DA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA DA UNICAMP

M388e Masson, Nádia, 1983-
Efeito da aplicação de flúor fosfato acidulado na composição
proteica da película salivar formada sobre esmalte / Nádia
Masson. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2012.

Orientador: Adriana Franco Paes Leme.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas,
Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Película Dentária. 2. Proteômica. 3. Espectrometria de
massas. I. Leme, Adriana Franco Paes. II. Universidade Estadual
de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Informações para a Biblioteca Digital

Título em Inglês: Effect of acidulated phosphate fluoride application on the
protein composition of salivary enamel pellicle

Palavras-chave em Inglês:

Dental pellicle

Proteomics

Mass spectrometry

Área de concentração: Cariologia

Titulação: Mestra em Odontologia

Banca examinadora:

Adriana Franco Paes Leme [Orientador]

Cíntia Pereira Machado Tabchoury

Severino Matias Alencar

Data da defesa: 14-12-2012

Programa de Pós-Graduação: Odontologia



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada em 14 de Dezembro de 2012, considerou a candidata NÁDIA MASSON aprovada.


Profa. Dra. ADRIANA FRANCO PAES LEME


Prof. Dr. SEVERINO MATIAS DE ALENCAR


Profa. Dra. CINTHIA PEREIRA MACHADO TABCHOURY

Dedico essa dissertação ao meu marido, Vinícius, e a minha mãe, Tina, por toda compreensão, estímulo e amor incondicional que me deu forças para seguir em frente. Sem esse suporte não poderia ter chegado ao final dessa etapa.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Muito especialmente, desejo agradecer à minha orientadora, **Profa. Dra. Adriana Franco Paes Leme**, pela disponibilidade, atenção dispensada, paciência e dedicação. Devo o profundo agradecimento pelo modo como sempre me apoiou e acompanhou ao longo desta árdua e custosa caminhada, sempre com muito respeito e carinho. Pelas alegrias, momentos felizes, desânimos, angústias e essencialmente pela compreensão. Ao final desta etapa fica a minha grande admiração pela sua imensa competência profissional e exemplo pessoal.

Ao **Prof. Dr. Jaime Aparecido Cury**, por ter me aceito no programa de pós-graduação, confiado no meu trabalho e ainda, por ter me dado a oportunidade de trabalhar com um tema tão desafiador. Seu conhecimento, competência e, sem dúvida, sua paixão pela pesquisa foram ingredientes indispensáveis para a realização dessa pesquisa.

Meu agradecimento mais profundo só poderia ser dedicado ao meu marido e à minha família: **Vinícius, Tina, Érica, Gil, Heverton, Livia e Luca**. O tempo todo ao meu lado incondicionalmente. Nos momentos mais difíceis, que não foram raros nestes últimos anos, sempre me fazendo acreditar que chegaria ao final dessa difícil, porém gratificante etapa. Sou grata por cada gesto carinhoso e cada sorriso recebido. Obrigada!

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Campinas por meio do seu Magnífico Reitor, **Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa**.

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, na pessoa do Diretor **Prof. Dr. Jacks Jorge Junior**.

À **Profa. Dra. Renata Cunha Matheus Rodrigues Garcia**, Coordenadora Geral da Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas.

À **Profa. Dra. Cíntia Pereira Machado Tabchoury**, Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da FOP-UNICAMP, pela contribuição na minha formação durante o curso de mestrado.

Ao **Prof. Dr. Jaime Aparecido Cury** e às **Profas. Dras. Livia Maria Andaló Tenuta e Adriana Franco Paes Leme** pelas sugestões e contribuições na fase de pré-qualificação.

Aos **Profs. Drs. Jaime Aparecido Cury e Ricardo Della Coletta** e à **Profa. Dra. Livia Maria Andaló Tenuta** pelas considerações e contribuições realizadas no exame de qualificação.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo, **FAPESP**, pela bolsa concedida (2009/ 12368-7).

Agradeço às técnicas do Laboratório de Espectrometria de Massas **Bianca Alves Pauletti, Sami Yokoo** e especialmente **Romênia Ramos Domingues** pela inestimável e imprescindível ajuda nas análises proteômicas.

Aos técnicos **Waldomiro Vieira Filho** e **José Alfredo da Silva** pela ajuda no laboratório.

A todos os voluntários dos pilotos e experimentos necessários para a realização dessa pesquisa, **Amanda Falcão, Karla Cook, Alhethea Ratti, Livia Helena Terra e Souza, Constanza Fernandez, Jerônimo Junior, Vinícius Oliveira, Romênia Ramos Domingues, Mariana Zanetti, Isadora Luana Flores**. Sem vocês essa pesquisa não seria possível!

À minha amiga **Amanda Falcão** pelas inúmeras vezes que me ajudou durante essa caminhada seja com discussões científicas, ajudas laboratoriais ou ainda com sua amizade sincera.

Preciso homenagear, ainda, as amigas queridas que de uma forma ou de outra contribuíram com sua força e estímulo para que eu conseguisse completar este percurso. À **Alhethea Ratti, Karla Cook** e **Livia Helena** deixo o meu obrigada.

Aos demais colegas de pós-graduação, pela agradável convivência e amizade durante esses anos.

Ao colega de pós-graduação **Willian Custódio** que me acompanhou nos primeiros passos na espectrometria de massas e por estar sempre disponível para me ajudar.

Aos colegas do Laboratório de Espectrometria de Massas do Laboratório Nacional de Biociências, **Annelize Zambon, Daniela Granato, Fernando Simabuco, Marília Belloni, Mariana Zanetti, Rebeca Kawahara** pela paciência, disponibilidade e imensa ajuda durante esses anos.

À **Isadora Luana Flores**, que me acompanhou de forma tão agradável em inúmeras viagens ao Laboratório Nacional de Biociências em Campinas.

A todos aqueles que estiveram ao meu lado e que de alguma forma contribuíram para o enriquecimento desta dissertação.

"Conheça todas as teorias, domine todas as técnicas, mas ao tocar uma alma humana, seja apenas outra alma humana."

(C. Jung)

RESUMO

A película adquirida é um filme proteico resultante da adsorção seletiva de proteínas presentes na saliva total à superfície dental. Devido ao seu contato com a superfície de esmalte, a película adquirida no esmalte desempenha um papel importante nos estágios iniciais da formação da placa dental por meio da modulação da aderência bacteriana. Tem sido reportado que o tratamento do esmalte com produtos de alta concentração de fluoreto leva a formação de uma camada de mineral do tipo fluoreto de cálcio (“CaF₂”) em sua superfície. Sabe-se que a adsorção proteica ao esmalte é um processo específico e dependente da natureza da superfície e pouco se conhece da influência da camada de “CaF₂” na composição da película salivar. A proposta deste estudo foi avaliar a composição da película salivar formada *in vitro* quando da aplicação de flúor fosfato acidulado no esmalte. Para tal, blocos de esmalte bovino foram aleatoriamente divididos em 3 grupos de tratamento. Cada bloco foi exposto ao tratamento com água destilada (controle negativo), solução de ácido fosfórico (controle ativo – H₃PO₄ 0,1 M pH 3,5) ou solução de flúor fosfato acidulado (NaF 0,5 M em H₃PO₄ 0,1 M pH 3,5) por 4 minutos. Os blocos foram então lavados, secos e imersos em saliva humana por 2 horas para a formação da película salivar. A película adquirida de cada grupo foi extraída, submetida ao protocolo de digestão com tripsina e os peptídeos gerados foram analisados por cromatografia líquida de fase reversa acoplada a uma interface com ionização por nanoelectrospray em um espectrômetro de massas LTQ Velos Orbitrap. Após processamento e análise dos dados gerados pelo espectrômetro de massas utilizando o programa Proteome Discoverer e ScaffoldQ+ foram identificadas 56 proteínas. Cada grupo de tratamento apresentou uma quantidade similar de proteínas totais identificadas e 17,8% das proteínas totais estavam presentes em todos os grupos de tratamento. Doze proteínas foram exclusivas do grupo tratado com água destilada, 11 exclusivas do grupo tratado com ácido fosfórico e 12 do grupo tratado com flúor fosfato acidulado. A quantificação relativa por contagem de espectros demonstrou que quando

da aplicação de flúor fosfato acidulado no esmalte a abundância de algumas proteínas diminui, dentre elas a proteína histatina-1. Entretanto, a abundância da proteína de S100-A9, confirmada por western blot, aumentou quando a superfície de esmalte foi tratada com flúor fosfato acidulado. Os dados sugerem que a modificação causada no esmalte pela aplicação de flúor fosfato acidulado influencia a composição da película adquirida no esmalte podendo ter um impacto na posterior colonização bacteriana inicial.

Palavras-chave: película dentária, fluoreto de fosfato acidulado, proteômica, espectrometria de massas.

ABSTRACT

The acquired pellicle is a protein film resulting from the selective adsorption of proteins present in whole saliva onto tooth surfaces. Because of its contact with enamel surfaces, the enamel pellicle plays an important role in the initial stages of plaque formation by modulating bacterial attachment. High concentrated fluoride product treatment of enamel has been reported to result in the formation of a layer of a CaF_2 -like material (“ CaF_2 ”) on the enamel surface. Protein adsorption to enamel is a specific process dependent on the nature of the surface, and little is known about the influence of this “ CaF_2 ” layer on pellicle composition. The purpose of this investigation was to gain further insights into the *in vitro* pellicle components when APF application is performed. Bovine enamel blocks were randomly divided in 3 groups. Each block was exposed to distilled water (negative control), or phosphoric acid (active control - 0.1 M H_3PO_4 pH 3.5) or acidulated phosphate fluoride (APF) (0.5 M NaF in 0.1 M H_3PO_4 pH 3.5) solution for 4 minutes. Blocks were then washed, dried and immersed in human saliva for 2 hours for enamel pellicle formation. AEP from each group was collected, subjected to trypsin digestion protocol and the peptides generated were analyzed by reverse-phase liquid chromatography coupled with nanoelectrospray ionization in a LTQ Velos Orbitrap mass spectrometer. After analyses of the data by Proteome Discoverer e ScaffoldQ+ programs 56 proteins were identified. Each treatment group presented a similar amount of total identified protein and 17.8% of total proteins were present in all four groups. Twelve proteins were exclusively in the group treated with water, 11 proteins were exclusively in the group treated with phosphoric acid and another 12 proteins were only present in the discs treated with APF solution. Relative proteomic quantification showed that the abundance of some proteins decreases with APF application, such as histatin-1. However, the concentration of S100 – A9, confirmed by immunoblotting analyses, increases when enamel surface was treated with APF solution. These data suggest that the modification

caused on enamel surface by APF application influences the composition of AEP and may have an impact on initial bacterial attachment.

Key-words: dental pellicle, acidulated phosphate fluoride, proteomics, mass spectrometry.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	1
PROPOSIÇÃO	4
CAPÍTULO 1:	
<i>APF application changes the protein composition of human acquired enamel pellicle</i>	5
CONSIDERAÇÕES FINAIS	23
CONCLUSÃO	25
REFERÊNCIAS	26
APÊNDICE	29
ANEXO	30

INTRODUÇÃO

A película adquirida de esmalte é um filme orgânico que recobre a superfície do esmalte dos dentes erupcionados (Dawes *et al.*, 1963). Sua formação ocorre pela adsorção seletiva de proteínas da saliva, do fluido gengival e de bactérias à superfície do esmalte, uma vez que apenas parte das proteínas presentes na saliva total é encontrada neste filme (Hay, 1967, 1973; Vacca Smith & Bowen, 2000; Yao *et al.*, 2003; Siqueira *et al.*, 2012a). Estudos demonstram que as primeiras proteínas que ligam ao esmalte dental possuem alta afinidade pelo mineral tipo hidroxiapatita (HA) e são conhecidas como proteínas precursoras da película. Fazem parte das proteínas precursoras histatinas, estaterina e proteínas rica em prolina (Hay, 1969, 1973, 1975; Bennick, 1987; Oppenheim *et al.*, 1971, 1986, 1988). Há evidências que essa adsorção ocorra, principalmente, por interações eletrostáticas entre as cargas dos resíduos das proteínas precursoras e os íons do esmalte (Hannig & Joiner, 2006). Sabe-se que a superfície dental tende a apresentar uma carga líquida negativa devido ao posicionamento estrutural dos grupamentos fosfatos os quais encontram-se posicionados superficialmente na estrutura cristalina. Quando em contato com a solução aquosa salivar, esta superfície negativa será coberta por íons cálcio carregados positivamente, formando uma camada de hidratação carregada positivamente (Arends & Jongebloed, 1977). Assim, as proteínas primariamente adsorvidas à superfície de esmalte estabelecem interações eletrostáticas entre a dupla camada iônica (íons cálcio e fosfato) e o seu correspondente grupo carregado negativa ou positivamente (Hannig & Joiner, 2006). Ademais, a ocorrência de resíduos de serinas fosforiladas nas proteínas precursoras da película, e ainda, a sua estrutura secundária e terciária são fatores que contribuem para a alta afinidade destas proteínas pelo esmalte dental (Hay and Moreno, 1979, Lamkin & Oppenheim, 1993; Helmerhorst & Oppenheim, 2007). Entretanto o mecanismo exato dos estágios iniciais de formação da película ainda não foi completamente elucidado.

Em uma segunda fase de formação da película salivar, observam-se interações das proteínas salivares com os agregados proteicos já adsorvidos à estrutura dental (Lamkin *et*

al., 1996). Evidências apontam que após duas horas a película parece atingir um equilíbrio entre adsorção e desadsorção das proteínas (Sönju & Rölla, 1973; Lankim *et al.*, 1996; Lendenmann *et al.*, 2000) formando uma película madura sobre a superfície dentária. Esta proximidade com o esmalte dental torna a película adquirida de esmalte a interface entre os minerais do esmalte e o ambiente oral (Lendenmann *et al.*, 2000). Com isso, a película participa de todos os eventos que ocorrem nesta interface desempenhando papel importante na proteção do esmalte contra ataques ácidos e na sua dissolução (Van Nieuw Amerongen *et al.*, 2004; Hannig & Joiner, 2006; Cheaib & Lussi, 2011), bem como na cristalização de sais de cálcio e fosfato (Lamkin & Oppenheim, 1993; Siqueira *et al.*, 2012a), na lubrificação da superfície dentária (Tabak *et al.*, 1982) e modulação da aderência bacteriana (Gibbons *et al.*, 1985; Gibbons, 1989; Douglas 1994; Lamkin & Oppenheim, 1993). O processo de adesão bacteriana compreende interações estereo-químicas específicas entre adesinas presentes na parede bacteriana e receptores encontrados na película adquirida (Gibbons, 1989; Douglas, 1994). Esses receptores incluem mucinas, aglutininas, proteínas ricas em prolina, estaterinas e enzimas como alfa-amilase, os quais modulam a adesão dos colonizadores primários (Douglas, 1994; Kolenbrander *et al.*, 2002). Os colonizadores primários são de grande importância, pois após a aderência à superfície dental estes proveem novos sítios de ligação gerando aderência de outros microrganismos (Kolenbrander & London, 1993; Marsh, 2003), além de proverem a adesão de substratos para os colonizadores subsequentes influenciando os estágios seguintes de formação do biofilme dental (Li *et al.*, 2004) sendo este fator chave para o desenvolvimento de cárie e doenças periodontais (Marsh, 2004). Dessa forma, mudanças na composição proteica da película adquirida podem gerar alterações no tipo de bactéria que formará a primeira camada do biofilme dental podendo influenciar a dinâmica de formação do biofilme dental.

No que concerne à composição da película adquirida, sabe-se que o substrato ao qual a película se forma influencia a sua composição dada à alta especificidade do seu processo de formação (Sönju & Glantz, 1975; Baier & Glantz, 1978; Edgerton & Levine, 1992; Lindh *et al.*, 1999; Carlen *et al.*, 2001; Cardenas *et al.*, 2007; Svendsen *et al.*, 2009; Hannig & Hannig, 2009). Sabe-se que para o controle da cárie dental em pacientes considerados de

alto risco a aplicação tópica profissional (ATF) de flúor é indicada (Marinho *et al.*, 2002, 2007). Entretanto, o efeito preventivo de produtos com alta concentração de fluoreto está principalmente relacionado à formação de reservatórios de flúor na superfície do esmalte na forma de fluoreto de cálcio (“CaF₂”) (Saxegaard & Rölla, 1988; Ögaard, 2001). Esses reservatórios de flúor depositados sobre a superfície do esmalte podem gerar alterações nas propriedades químicas da superfície de esmalte (Kambara & Norde, 1995) e, por conseguinte alterar a afinidade proteica por essa superfície.

Eggen & Röla (1983) observaram que a HA tratada por 3 meses com fluoreto de sódio adicionado de ácido láctico pH 4 adsorveu menos albumina, porém mais lisozima quando comparada com HA normal. Já, a análise do padrão de adsorção dessas duas proteínas estudadas por Rykke e colaboradores (1989) demonstrou que o pó de “CaF₂” adquiriu menor quantidade de ambas as proteínas quando comparado com a HA, porém o tratamento da superfície de “CaF₂” com fosfato, aumentou significativamente a adsorção proteica. Em contrapartida, Kambara & Norde (1995) demonstraram que a aplicação de fluoreto neutro por 4 minutos em HA modifica as características físico-químicas da sua superfície aumentando a afinidade da proteína lisozima.

Em acréscimo, a análise da película adquirida formada *in vivo* coletada de esmalte sem tratamento e esmalte tratado com fluoreto de sódio (0,6% em pH 1,9) por 1 minuto demonstrou não haver diferenças na composição dos aminoácidos entre esses dois substratos (Rykke *et al.*, 1989). Por outro lado, estudo recente encontrou diferenças qualitativas e quantitativas na composição proteica da película adquirida formada sobre discos de HA normal e tratados com soluções de fluoreto neutro em altas concentrações (1, 2 e 5%), sendo a maior parte das diferenças encontradas nos grupos tratados por 2 horas com soluções neutras de fluoreto de sódio nas concentrações de 2 e 5%, sendo o grupo tratado com solução de flúor a 1% muito semelhante aos resultados encontrados para a HA normal (Siqueira *et al.*, 2012).

Contudo, sabe-se que a formação de “CaF₂” durante a aplicação tópica de fluoreto é dependente de diversos fatores dentre eles o tempo de aplicação e o pH da solução (Ögaard, 2001). A formação de “CaF₂” em pH neutro requer altas concentrações de fluoreto ou um

longo tempo de exposição (Ogaard, 2001), enquanto o acréscimo de ácido a solução fluoretada aumenta a formação de fluoreto de cálcio (Larsen & Jensen, 1986, Larsen & Richards, 2001). Soluções de fluoreto de sódio acidificadas pela adição de ácido fosfórico foram desenvolvidas para melhorar a eficácia anticárie dos produtos fluoretados (Wellock & Brudevold, 1963; Brudevold & DePaola, 1966; Brudevold *et al.*, 1967) e desde então a aplicação profissional de flúor fosfato acidulado (FFA) tem sido um método utilizado para a prevenção da cárie dentária e sua eficácia é reconhecidamente baseada em evidências científicas (Marinho *et al.*, 2002). Dentre as recomendações do uso de FFA, a aplicação do produto por 4 minutos tem sido recomendada (Ripa, 1990).

Apesar dos vários estudos realizados elucidarem informações importantes sobre a influência do fluoreto na composição da película salivar adquirida, nenhum estudo foi conduzido para explorar o efeito do FFA simulando o tempo clínico de aplicação. Dessa forma, esse estudo teve o objetivo de avaliar a influência do FFA na composição de proteínas da película salivar adquirida em esmalte utilizando espectrometria de massas baseada em proteômica.

PROPOSIÇÃO

O presente estudo *in vitro* teve como objetivo avaliar o efeito da aplicação prévia em esmalte de flúor fosfato acidulado por 4 minutos na composição da película salivar adquirida.

Este trabalho foi realizado no formato alternativo, conforme deliberação número 002/06 da Comissão Central de Pós-Graduação (CCPG) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) (Anexo 1).

CAPÍTULO 1

Este artigo foi submetido como “short communication” ao periódico “Caries Research” conforme apresentado no comprovante de envio presente no anexo 3.

APF application changes the protein composition of human acquired enamel pellicle

Nadia Masson^{1,2}; Romênia Ramos Domingues²; Jaime Aparecido Cury JA¹, Adriana Franco Paes Leme^{2*}.

¹Piracicaba Dental School, University of Campinas, UNICAMP, Piracicaba, Brazil.

²Mass Spectrometry Laboratory, Brazilian Biosciences National Laboratory, LNBio, CNPEM, Campinas, Brazil.

SHORT TITLE: APF application changes the protein composition

KEY WORDS: dental pellicle, acidulated phosphate fluoride, proteomics, mass spectrometry.

***CORRESPONDING AUTHOR:** Adriana Franco Paes Leme, email: adriana.paesleme@lnbio.org.br. Brazilian Biosciences National Laboratory, LNBio, CNPEM, 13083-970, Campinas, Brazil, Phone: +55 19 3512-1118; Fax: +55 19 3512-1006.

This paper is based on a thesis submitted by the first author to Piracicaba Dental School, UNICAMP, SP, Brazil, in partial fulfillment of the requirements for the Master Degree in Dentistry (Cariology Area).

ABSTRACT

We evaluated, by proteomic analysis, whether the chemical changes provoked on enamel by acidulated phosphate fluoride (APF) application alter the protein composition of acquired enamel pellicle. Enamel slabs, pretreated with distilled water (negative control), phosphoric acid (active control) or APF solution, were immersed in human saliva for pellicle formation. The adsorbed proteins were extracted and analyzed by LC-MS/MS. Fifty-six proteins were identified, 12 exclusive to APF and 11 to phosphoric acid. APF decreased the concentration of histatin-1, but increased the concentration of S100-A9, which is confirmed by immunoblotting. The findings suggest that APF application changes the acquired enamel pellicle composition.

INTRODUCTION

The acquired enamel pellicle is a protein film formed by the selective adsorption of salivary proteins on to enamel surface (Lendenmann *et al.*, 2000; Hannig and Joiner, 2006; Siqueira *et al.*, 2012a). Due to the high specificity of this process, pellicle composition is direct dependent of the underlying substratum (Svendsen and Lindh, 2009; Hannig and Hannig 2009). It is well known that professional acidulated phosphate fluoride (APF), a widely used product due to its recognized anticaries effect (Marinho *et al.*, 2002), reacts with enamel surface and the products of reaction formed, as CaF_2 -like material, may change the chemical properties of enamel. Then, it might influence the affinity and adsorption behavior of salivary proteins to enamel surface and therefore it can have an impact on initial oral biofilm formation, considering that bacteria bind in a stereochemically specific manner to complementary molecules in the pellicle (Gibbons *et al.*, 1985; Gibbons, 1989).

Only limited information is available from the literature concerning the effect of fluoride application on pellicle composition. Although single-component studies showed differences in protein adsorption on hydroxyapatite (HA) and “ CaF_2 ” (Eggen & Röla, 1983; Rykke *et al.*, 1989; Kambara & Nordi, 1995), no major differences were found *in vivo* in amino acid composition between pellicle collected from CaF_2 -covered enamel and pellicle collected from normal enamel (Rykke *et al.*, 1989). Nevertheless, a recent study using

proteomic approach demonstrated that HA discs pretreated for 2 hours with different concentrations of neutral fluoride solutions modulates the pellicle composition (Siqueira *et al.*, 2012b). Although all the results are valuable, from a clinical perspective, it is still not known the effect of APF on pellicle composition.

Therefore, we simulated *in vitro* the clinical timing application of APF solution on enamel surface and evaluated its effect on the protein composition of the human salivary pellicle by mass spectrometry-based proteomics.

MATERIAL & METHODS

Enamel slabs preparation

Bovine incisor teeth, whose roots were removed, were stored in 2% formol solution for a period of at least 30 days and used to prepared enamel slabs as described previously (Ccahuana-Vasquez and Cury, 2010). No polishing was performed on enamel surface to keep its natural feature. Following, enamel slabs were isolated by wax leaving only the dental external surface exposed to the treatments. Orthodontic wires were attached to 24-well plate covers, and the slabs were fixed in the orthodontic wires allowing immersion of all slabs from the same treatment group at the same time.

Treatments

One hundred and twenty bovine enamel slabs were randomly divided into three groups of 40 specimens each: 1- DW (distilled water - negative control), 2- H₃PO₄ (phosphoric acid solution – active control) or 3- APF (acidulated phosphate fluoride solution). Slabs from group 1 (DW) were treated with distilled water; from group 2 (H₃PO₄) with a solution containing 0.1 M H₃PO₄, pH 3.5; and from group 3 (APF) with APF solution containing 0.5 M NaF in 0.1 M H₃PO₄, pH 3.5. All the treatments were performed by immersing the slabs individually into 2 mL of the respective solution for 4 min under agitation (Tenuta et al., 2008). Subsequently, slabs were washed 3 times with distilled water to remove any excess solution and gently dried with absorbent paper.

Saliva collection

Whole saliva was collected from eight healthy, non-medicated individuals after providing informed written consent approved by the Ethics Committee of Piracicaba Dental School. Saliva samples were always collected in the morning (8–9 a.m.) under masticatory stimulation induced by Parafilm chewing (Pechiney, Chicago, IL) (Paes Leme *et al.*, 2003). Participants were in starvation and were instructed not to brush before saliva collection. The samples were kept on ice during the collection procedure and immediately after the collection whole saliva samples were centrifuged at 10,000 x g for 5 min at 4 °C and the supernatants were recovered. All experiments were carried out with saliva pools derived from the same eight individuals.

In vitro pellicle formation

For in vitro pellicle formation, slabs from all treatment groups were individually immersed in 2 mL of processed saliva during 2 h at 37 °C \pm 2 under agitation. After 2 h, slabs were removed from saliva incubation, washed three times in distilled water to remove non-adsorbed proteins and kept in humid environment.

Pellicle extraction

In an attempt to eliminate variability among the enamel slabs and to extract the amount of proteins necessary of the LC-MS/MS analysis, the extraction of adsorbed proteins all slabs (n=40, 28 mm² surface area/each slab) from the same treatment group were placed in a 15 mL-polystyrene tube, containing 8 mL of 100 mM ammonium bicarbonate. The extraction of pellicle proteins was carried out by vortexing the sample for 120 s followed by sonication (Branson, Sonifier 50, Danbury, CT USA) for 5 min in an ice bath at 4 °C (determined in a pilot study). Following, samples were vortexed again for 30 s, then slabs were removed and the resulting solution containing released proteins was recovered and lyophilized. The samples were resuspended in 0.1 mL of distilled water, centrifuged at 4,000 rpm for 10 min (5810 R, Eppendorf, Hamburg, Germany), the supernatant was collected and any salt precipitation of ammonium bicarbonate formed was discarded.

Pellicle extraction

To achieve the extraction of adsorbed proteins, all slabs from the same treatment group were placed in a 15 mL-polystyrene tube, containing 8 mL of 100 mM ammonium

bicarbonate. The extraction of pellicle proteins was carried out by vortexing the sample for 120 s followed by sonication (Branson, Sonifier 50, Danbury, CT USA) for 5 min in an ice bath at 4 °C (determined in a pilot study). Following, samples were vortexed again for 30 s, then slabs were removed and the resulting solution containing released proteins was recovered and lyophilized. The samples were resuspended in 0.1 mL of distilled water, centrifuged at 4,000 rpm for 10 min (5810 R, Eppendorf, Hamburg, Germany), the supernatant was collected and any salt precipitation of ammonium bicarbonate formed was discarded.

Mass Spectrometry

Samples were denatured with urea (final concentration 1.6 M), reduced with DTT (final concentration 5 mM) and alkylated with iodoacetamide (final concentration 14 mM) for 30 min at room temperature, digested with trypsin (20 ng/μL), dried down in a vacuum concentrator and reconstituted in 20 μL of 0.1% formic acid. The resulting peptide mixture was separated by C18 (100 mm x 75 μm) (Proxeon) EASY-nLC coupled with EASY-nano electrospray tandem mass spectrometry on a LTQ Velos Orbitrap (Thermo Fisher Scientific) mass spectrometer at a flow rate of 300 nL/min. The gradient was 0 - 90% acetonitrile in 0.1% formic acid over 60 min (Aragão *et al.*, 2012b).

Data Analysis

All datasets of proteins were processed using the workflow feature in Proteome Discoverer software v.1.3 and the msf files were analyzed in ScaffoldQ+ v.3.3.2 (Proteome Software), filtered using xcorr cutoffs (+1>1.8, +2>2.2, +3>2.5 and +4>3.5), using the normalized number of total spectra counting to evaluate the protein abundance (Didangelos *et al.*, 2011; Araújo *et al.*, 2012a). Spectral count normalizing entails averaging the spectrum counts across the samples, followed by averaging the spectral counts, and then multiplying the spectrum counts in each sample by the average divided by the individual sample sum. Once normalized, the ScaffoldQ+ results were exported to excel files. Differences in protein abundance were considered when there was at least 1.5-fold difference between the ratio of the spectral counts for each group. The scoring parameters in ScaffoldQ+ were set to obtain a false discovery rate less than 5%. Additionally, manual validation of the CID spectrum of a peptide from S100-A9 protein, validated by immunoblotting, was performed

(Fig. 1). The theoretical isoelectric point (pI) was calculated for each group using the theoretical protein sequence obtained by Uniprot and analyzed in Expasy.

Immunoblotting

In order to validate one of the proteins identified by LC-MS/MS analysis, an independent experiment was carried out to perform an immunoblotting against S100-A9 calcium-binding protein as described before (Aragão *et al.*, 2012b). The proteins extracted from all treatment groups were separated by 4-15% SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose membrane (GE Healthcare) by semi-dry system (Bio-Rad). It was used the anti-S100-A9 (1:1000, gift from Dr. Philippe Tessier), followed by horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG (1:5000, Calbiochem). The visualization of S100-A9 was achieved by chemiluminescence with the ECL kit (Amersham Biosciences). Positive control of S100-A9 recombinant protein (gift from Dr. Philippe Tessier) was used. The densitometry of the bands was analyzed by ImageJ software (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

RESULTS AND DISCUSSION

This study indicates that professional APF application for 4 minutes, as it has been used to prevent caries disease, modulates acquired enamel pellicle composition, as can be observed in Venn diagram (Fig. 2). These results confirm earlier findings that have suggested that the underlying substratum influences the pellicle composition (Sonju and Glantz 1975; Baier and Glantz 1978; Svendsen and Lindh, 2009). The LC-MS/MS analysis of the trypsin-digested proteins identified in total 56 proteins (Table 1), and each treatment group showed similar number of identified proteins from acquired enamel pellicle, being 31, 29 and 33 for distilled water (DW), phosphoric acid (H_3PO_4) and acidulated phosphate fluoride (APF) groups, respectively. However, differences in enamel pellicle protein composition among the groups were observed. The use of H_3PO_4 as an active control allowed us to assign to fluoride the changes found exclusively on APF group, once the pellicles formed on enamel treated with H_3PO_4 and APF were distinctly. It is well known that when acidified fluoride products are applied to enamel surface, it dissolves enamel surface and concomitantly precipitates fluoride-containing reaction products and the major reaction product formed is CaF_2 -like

material (Dijkman *et al.*, 1982; Ogaard, 2001). Therefore, changes found in pellicle composition of APF group may be attributed to “CaF₂” presence.

Ten proteins (17.8 %) were identified in acquired enamel pellicle in all treatments, such as amylase, histatin, calcium-binding proteins, cystatin and keratins (Table 1). Considering the fold-change of 1.5 (Paes Leme *et al.*, 2012; Aragão *et al.*, 2012a), amylase has similar abundance among the samples and it was identified in a notable manner with the highest spectral counts, which means a high abundance of this protein in acquired enamel pellicle independently of the enamel pretreatment. This result is consistent with earlier findings that indicated that amylase is one of the major components of pellicle (Hannig *et al.*, 2004, 2005; Siqueira *et al.*, 2012a). However, the enamel surface modifications showed an effect in the abundance of some proteins, such as histatin-1, a recognized pellicle precursor that showed to be with low abundance in enamel pellicle from slabs pretreated with APF. In a recently study, the same protein showed lower affinity for HA slabs pretreated with neutral fluoride solution than for HA with no treatment (Siqueira *et al.*, 2012b).

Interestingly, the formation of “CaF₂” on enamel surface increases the abundance of S100–A9 protein, a low-molecular-weight protein that has been shown to be a component of saliva (Loo *et al.*, 2010), gingival crevicular fluid (Kojima *et al.*, 2000), *in vivo* acquired enamel pellicle (Yao *et al.*, 2003; Siqueira *et al.*, 2007) and biofilm (Paes Leme *et al.*, 2008; Moi *et al.*, 2012). Considering that S100–A9 was found in all treatment groups of this study and was, notably, the only protein with higher abundance in group treated with APF solution, one of the identified peptides of this protein was manually validated (Fig. 1). In addition, an independent experiment was carried out and it confirmed by immunoblotting the presence and the higher abundance of S100–A9 in the enamel pretreated with APF (Fig 3). This may be explained by the fact that once S100-A9 has the ability to bind calcium ions, it may react with “CaF₂” deposited on enamel surface by APF application increasing its affinity to this CaF₂-covered surface when compared to untreated enamel. Due to its calcium-binding domain this protein is possibly involved in enamel deposition (Yao *et al.*, 2003), which may have a potential significance for caries disease (Ambatipudi *et al.*, 2010).

and calcium reservoir (Paes Leme *et al.*, 2008), however, the specific role of this protein in acquired enamel pellicle still should be investigated.

It is noticeable that besides the proteins identified in all treatment groups, we found that some proteins were exclusive from each treatment (Fig. 2). Twelve proteins were found exclusively in pellicle formed on slabs treated with DW (Table 1). Enamel pellicle from slabs treated with H_3PO_4 showed 11 exclusively proteins and slabs that received APF application before pellicle formation showed 12 exclusively proteins. For instance, statherin was one of the proteins found exclusively in normal enamel (DW group) and there is clear evidence that this protein has a high affinity to enamel surface showing a typical approximation of this surface in transmission electron micrographs analyses of pellicle (Schüpbach *et al.*, 2001). The strong interaction of statherin with HAP is mediated by the acidic N-terminus, where two phosphoserines are located (Lamkin and Oppenheim, 1993; Makrodimitris *et al.*, 2007). It is possible to speculate that H_3PO_4 alone and APF application interfered with the electrostatic interaction between enamel and statherin, even by the “ CaF_2 ” obstruction of the hydroxyapatite-binding site for statherin, or by the changes on enamel surface charges due to the mineral loss. The importance of this finding may rely on the biological activities of this protein that includes the inhibition of HA nucleation and growth, lubrication of the enamel surface, and when adsorbed onto HA the binding of *A. viscosus* (Gibbons and Hay, 1988).

In an effort to gain further insight into the profile of proteins found exclusive in each treatment group, the identified proteins were analyzed with respect to the theoretical isoelectric point (pI) values. This comparison revealed that pellicle extract from slabs treated with APF solution contained more proteins with the pI next to lower acidic end (pI ≤ 5) of the pI scale, as shown in Fig. 2. It seems that the formation of minerals of CaF_2 -like material on enamel surface by the APF application increases the affinity of negatively charged proteins considering the saliva pH 7.0. A possible explanation may be that APF application slightly alters the surface charge rendering the enamel surface net positively charged contributing for the attachment of negative molecules (Kambara and Norde, 1995).

Nevertheless, protein pI is not the only force that drives pellicle formation, given that the affinity will be strongly influenced by the secondary and tertiary protein structures. This relies on the cluster of charged residues found in the surface of the native molecule, influencing the probability of binding (Hay and Moreno, 1979). Moreover, the polarity reflected in the hydrophilicity and hydrophobicity of proteins and the sorbent surfaces have a great impact on the adsorption process and must be considered to understand the interaction between saliva proteins and tooth surface (Kambara and Norde, 1995; Hannig and Hannig, 2009). Besides, it is possible that during the pellicle formation some proteins adsorb directly to the substrata while some proteins have an indirect adsorption by interacting with other proteins already bounded.

Taken together, the results suggest that APF application modulates salivary pellicle composition considering some proteins were distinctly adsorbed on to the different surface treatment substrata. From a clinical perspective, the application of APF for caries prevention may influence acquired pellicle functions. We expect that our findings will provide the biochemical basis for further studies to elucidate both the mechanism involved in the adsorption of saliva proteins to CaF₂-covered enamel and its influence on plaque formation.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors express their appreciation to the volunteers for their valuable participation. This study was supported by FAPESP Scholarship Proc. no. 2009/12368-7 and Grant no. 2010/19278-0. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. We thank Dr. Philippe A. Tessier from the Centre de Recherche du Centre Hospitalier Universitaire de Quebec, Quebec, Canada for the kindly gift of the S100 antibody. All authors participated of the elaboration of this article, as follows: Conceived and designed the experiments: NM, JAC, AFPL. Performed the experiments: NM. Analyzed the data: NM, RRD, JAC, AFPL. Wrote the paper: NM, AFPL, JAC.

REFERENCES

Ambatipudi KS, Hagen FK, Delahunty CM, Han X, Shafi R, Hryhorenko J *et al.* Human common salivary protein 1 (CSP-1) promotes binding of *Streptococcus mutans* to experimental salivary pellicle and glucans formed on hydroxyapatite surface. *J Proteome Res.* 2010; 9(12): 6605-14.

Aragão AZ, Belloni M, Simabuco FM, Zanetti MR, Yokoo S, Domingues RR *et al.* Novel Processed Form of Syndecan-1 Shed from SCC-9 Cells Plays a Role in Cell Migration. *PLoS One.* 2012a; 7(8): e43521.

Aragão AZ, Nogueira ML, Granato DC, Simabuco FM, Honorato RV, Hoffman Z *et al.* Identification of novel interaction between a disintegrin and metalloprotease-17 (ADAM17) and thioredoxin-1. *J Biol Chem.* 2012b Oct 26.

Baier RE, Glantz PO. Characterization of oral in vivo films formed on different types of solid surfaces. *Acta Odontol Scand.* 1978; 36(5): 289-301.

Ccahuana-Vásquez RA, Cury JA. *S. mutans* biofilm model to evaluate antimicrobial substances and enamel demineralization. *Braz Oral Res.* 2010; 24(2): 135-41.

Didangelos A, Yin X, Mandal K, Saje A, Smith A, Xu Q *et al.* Extracellular matrix composition and remodeling in human abdominal aortic aneurysms: a proteomics approach. *Mol Cell Proteomics.* 2011; 10(8): M111.008128.

Dijkman AG, Tak J, Arends J. Fluoride deposited by topical applications in enamel. KOH-soluble and acquired fluoride. *Caries Res.* 1982; 16(2): 147-55.

Eggen KH, Rølla G. Surface properties of fluoride treated hydroxyapatite as judged by interactions with albumin and lysozyme. *Scand J Dent Res.* 1983; 91(5): 347-50.

Gibbons RJ, Etherden I, Moreno EC. Contribution of stereochemical interactions in the adhesion of *Streptococcus sanguis* C5 to experimental pellicles. *J Dent Res.* 1985; 64(2): 96-101

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

Gibbons RJ. Bacterial adhesion to oral tissues: a model for infectious diseases. *J Dent Res.* 1989; 68(5): 750-60.

Hannig C, Attin T, Hannig M, Henze E, Brinkmann K, Zech R. Immobilisation and activity of human alpha-amylase in the acquired enamel pellicle. *Arch Oral Biol.* 2004; 49(6): 469–78.

Hannig C, Hannig M, Attin T. Enzymes in the acquired enamel pellicle. *Eur J Oral Sci.* 2005; 113(1): 2-13. Review.

Hannig M, Joiner A. The structure, function and properties of the acquired pellicle. *Monogr Oral Sci.* 2006; 19: 29-64.

Hannig C, Hannig M. The oral cavity--a key system to understand substratum-dependent bioadhesion on solid surfaces in man. *Clin Oral Investig.* 2009; 13(2): 123-39.

Hay DI, Moreno EC. Differential adsorption and chemical affinities of proteins for apatitic surfaces. *J Dent Res.* 1979; 58(Spec Issue B): 930-42.

Kambara M, Norde W. Influence of fluoride applications on some physicochemical surface properties of synthetic hydroxyapatite and human dental enamel and its consequences for protein adsorption. *Caries Res.* 1995; 29(3): 210-7.

Kojima T, Andersen E, Sanchez JC, Wilkins MR, Hochstrasser DF, Pralong WF *et al.* Human gingival crevicular fluid contains MRP8 (S100A8) and MRP14 (S100A9), two calcium-binding proteins of the S100 family. *J Dent Res.* 2000; 79(2): 740-7.

Lamkin MS, Oppenheim FG. Structural features of salivary function. *Crit Rev Oral Biol Med* 1993; 4(3-4): 251-9.

Lendenmann U, Grogan J, Oppenheim FG. Saliva and dental pellicle—a review. *Adv Dent Res.* 2000; 14: 22-8. Review.

Loo JA, Yan W, Ramachandran P, Wong DT. Comparative Human Salivary and Plasma Proteomes. *J Dent Res.* 2010; 89(10): 1016-23.

Makrodimitris K, Masica DL, Kim ET, Gray JJ. Structure prediction of protein-solid surface interactions reveals a molecular recognition motif of statherin for hydroxyapatite. *J Am Chem Soc.* 2007; 129 (44): 13713-22

Marinho VCC, Higgins JPT, Logan S, Sheiham A. Fluoride gels for preventive dental caries in children and adolescents. *Cochrane Database Syst Rev* 2002; 2: CD002280.

Moi GP, Cury JA, Dombroski TC, Pauletti BA, Paes Leme AF. Proteomic Analysis of Matrix of Dental Biofilm Formed under Dietary Carbohydrate Exposure. *Caries Res.* 2012; 46(4): 339-45.

Ögaard B. CaF₂ formation: cariostatic properties and factors of enhancing the effect. *Caries Res* 2001; 35(suppl 1): 40-4.

Paes Leme AF, Tabchoury CP, Zero DT, Cury JA. Effect of fluoridated dentifrice and acidulated phosphate fluoride application on early artificial carious lesions. *Am J Dent*. 2003; 16(2): 91-5.

Paes Leme AF, Bellato CM, Bedi G, Cury AA, Koo H, Cury JA. Effects of sucrose on the extracellular matrix of plaque-like biofilm formed *in vivo*, studied by proteomic analysis. *Caries Res*. 2008; 42(6): 435-43.

Paes Leme AF, Sherman NE, Smalley DM, Sizukusa LO, Oliveira AK, Menezes MC, Fox JW, Serrano SM. Hemorrhagic activity of HF3, a snake venom metalloproteinase: insights from the proteomic analysis of mouse skin and blood plasma. *J Proteome Res*. 2012; 11(1): 279-91.

Rykke M, Sonju T, Skjorland K, Rolla G. Protein adsorption to hydroxyapatite and to calcium fluoride *in vitro* and amino acid analyses of pellicle formed on normal enamel and on calcium-fluoride-covered enamel *in vivo*. *Acta Odontol Scand*. 1989; 47(4): 245-51.

Schüpbach P, Oppenheim FG, Lendenmann U, Lamkin MS, Yao Y, Guggenheim B. Electron-microscopic demonstration of proline-rich proteins, statherin, and histatins in acquired enamel pellicles *in vitro*. *Eur J Oral Sci*. 2001; 109(1): 60-8.

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

Siqueira WL, Custodio W, McDonald EE. New insights into the composition and functions of the acquired enamel pellicle. *J Dent Res*. 2012a; 91(12): 1110-8.

Siqueira WL, Bakkal M, Xiao Y, Sutton JN, Mendes FM. Quantitative proteomic analysis of the effect of fluoride on the acquired enamel pellicle. *PLoS One*. 2012b; 7(8): e42204.

Sönju T, Glantz PO. Chemical composition of salivary integuments formed *in vivo* on solids with some established surface characteristics. *Arch Oral Biol*. 1975; 20(10): 687-91

Svendsen IE, Lindh L. The composition of enamel salivary films is different from the ones formed on dental materials. *Biofouling*. 2009; 25(3): 255-61.

Tenuta LM, Cerezetti RV, Del Bel Cury AA, Tabchoury CP, Cury JA. Fluoride release from CaF₂ and enamel demineralization. *J Dent Res*. 2008; 87(11): 1032-6.

Yao Y, Berg EA, Costello CE, Troxler RF, Oppenheim FG. Identification of protein components in human acquired enamel pellicle and whole saliva using novel proteomics approaches. J Biol Chem. 2003; 278(7): 5300-8.

TABLE

Table 1. Proteins identified *in vitro* in acquired enamel pellicle by LC-MS/MS

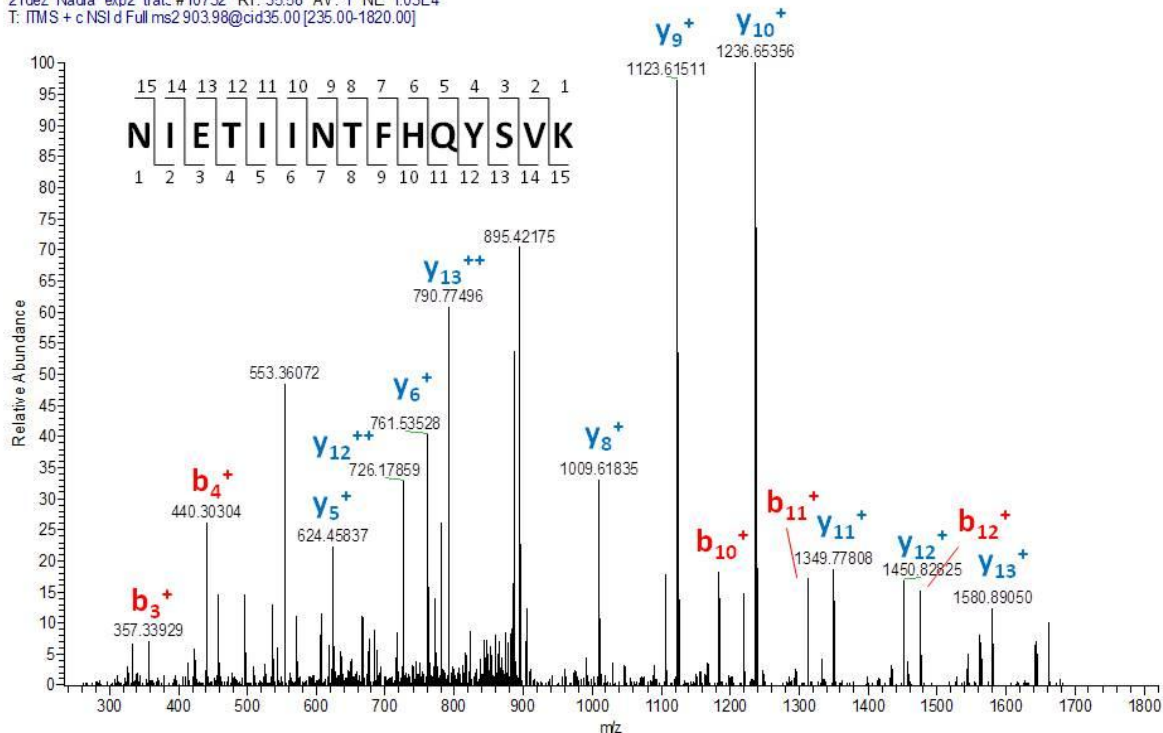
Accession Number		Identified Proteins (56)	Normalized Spectral counts		
			DW	H ₃ PO ₄	APF
Proteins identified in all treatment groups					
IPI00300786	Alpha-amylase 1	19.17	18.01	19.46	
IPI00220327	Keratin, type II cytoskeletal 1	13.53	6.43	11.98	
IPI00009865	Keratin, type I cytoskeletal 10	5.64	9.01	5.99	
IPI00021304	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal	5.64	7.72	1.5	
IPI00032294	Cystatin-S	2.26	1.29	1.5	
IPI00027462	Protein S100-A9	1.13	1.29	2.25	
IPI00012024	Histatin-1	2.26	2.57	0.75	
IPI00023011	Submaxillary gland androgen-regulated protein 3B	3.38	3.86	1.5	
IPI00007047	Protein S100-A8	1.13	1.29	1.5	
IPI00300725	Keratin, type II cytoskeletal 6A	3.38	1.29	0.75	
Proteins identified exclusively in slabs pretreated with DW (group 1)					
IPI00015182	cDNA FLJ51921, highly similar to Multidrug resistance-associated protein 6	1.13	-	-	
IPI00027547	Dermcidin	1.13	-	-	
IPI00031519	Isoform 1 of DNA (cytosine-5)-methyltransferase 1	1.13	-	-	
IPI00386418	Isoform 2 of Myelin expression factor 2	1.13	-	-	
IPI00219171	Isoform 2 of POU domain, class 2, transcription factor 1	1.13	-	-	
IPI00973733	Isoform 3 of Intraflagellar transport protein 88 homolog	1.13	-	-	
IPI00010228	Isoform 3 of SOSS complex subunit B2	1.13	-	-	
IPI00003927	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase D	1.13	-	-	
IPI00383517	Prostate specific antigen	1.13	-	-	
IPI00022990	Statherin	1.13	-	-	
IPI00007682	V-type proton ATPase catalytic subunit A	1.13	-	-	
IPI00383660	Zinc finger protein 530	1.13	-	-	
Proteins identified exclusively in slabs pretreated with H ₃ PO ₄ (group 2)					
IPI00008580	Antileukoprotease	-	1.29	-	
IPI00166729	Zinc-alpha-2-glycoprotein	-	1.29	-	
IPI00289535	cDNA FLJ78497	-	1.29	-	
IPI00022463	Serotransferrin	-	1.29	-	
IPI00903112	cDNA FLJ36533 fis, clone TRACH2004428. highly similar to Lactotransferrin (Fragment)	-	1.29	-	
IPI00003441	Isoform 1 of Protein osteopotentia homolog	-	1.29	-	
IPI00012948	Proheparin-binding EGF-like growth factor	-	1.29	-	
IPI00022974	Prolactin-inducible protein	-	1.29	-	
IPI00027019	Proline-rich protein 4	-	1.29	-	
IPI00219806	Protein S100-A7	-	1.29	-	
IPI00550382	cDNA FLJ33172 fis, clone ADRGL2002029. highly similar to Equilibrative nucleoside transporter 1	-	1.29	-	

Proteins identified exclusively in slabs pretreated with APF (group 3)				
IPI00219254	Isoform RSRFC4 of Myocyte-specific enhancer factor 2A	-	-	3.74
IPI00013382	Cystatin-SA	-	-	1.5
IPI00167941	Midasin	-	-	0.75
IPI00304808	Isoform 1 of Kallikrein-1	-	-	0.75
IPI00423461	Putative uncharacterized protein DKFZp686C02220 (Fragment)	-	-	0.75
IPI00004573	Polymeric immunoglobulin receptor	-	-	0.75
IPI00009650	Lipocalin-1	-	-	0.75
IPI00018909	Trefoil factor 3	-	-	0.75
IPI00061277	Mdm2-binding protein	-	-	0.75
IPI00328737	Isoform 1 of Zinc finger protein 598	-	-	0.75
IPI00398162	Isoform 2 of Nebulin-related-anchoring protein	-	-	0.75
IPI00413961	PTK2 protein tyrosine kinase 2 isoform b variant	-	-	0.75
Proteins identified in slabs pretreated with DW and H ₃ PO ₄ (group 1 and 2)				
IPI00893844	Isoform 1 of Putative E3 ubiquitin-protein ligase SH3RF1	1.13	1.29	-
IPI00009867	Keratin type II cytoskeletal 5	3.38	2.57	-
Proteins identified in slabs pretreated with DW and APF (group 1 and 3)				
IPI00019038	Lysozyme C	1.13	-	2.99
IPI00855918	Uncharacterized protein (Mucin - 5B)	2.26	-	2.25
IPI00299078	Salivary acidic proline-rich phosphoprotein	1.13	-	2.25
IPI00552432	Basic salivary proline-rich protein 2	1.13	-	0.75
IPI00305477	Cystatin-SN	1.13	-	0.75
Proteins identified in slabs pretreated with H ₃ PO ₄ and APF (group 2 and 3)				
IPI00022434	Uncharacterized protein (Albumin)	-	7.72	8.98
IPI00099110	Isoform 1 of Deleted in malignant brain tumors 1 protein	-	1.29	0.75
IPI01011177	Uncharacterized protein	-	1.29	0.75
IPI00019359	Keratin, type I cytoskeletal 9	-	1.29	2.99

Group 1 – DW - slabs treated with distilled water; Group 2 – H₃PO₄ - slabs treated with phosphoric acid solution; Group 3 – APF - slabs treated with acidulated phosphate fluoride solution. “-” means that peptides were not identified in the treatment either due to their absence/low detection limits or due the required parameter thresholds in ScaffoldQ+.

a

21dez_Nadia_exp2_trat3_#10732_RT: 35.58_AV: 1_NL: 1.03E4
T: ITMS + c NSI d Full ms2 903.98@cid35.00 [235.00-1820.00]



b

MTCKMSQLERNNIETIINTFHQYSVKLGHPTDNLNQGEFKELVRKDLQNFLKKENKNEKVIEHIM
EDLDTNADKQLSFEFIMLMARLTWASHEKMHEGDEGPGHHHKPGLGEGTP

Figure 1. (a) CID spectrum of a S100–A9 peptide identified by LC-MS/MS. S100–A9 was identified in salivary pellicles formed on enamel treated with distilled water (DW), phosphoric acid solution (H_3PO_4) and acidulated phosphate fluoride solution (APF) by LC-MS/MS. The spectrum of S100–A9 peptide (m/z 1806.95464, + 2, IPI00027462) was manually validated for b and y ion series. **(b)** Full-length protein sequence of S100-A9. The peptide identified by MS is underlined.

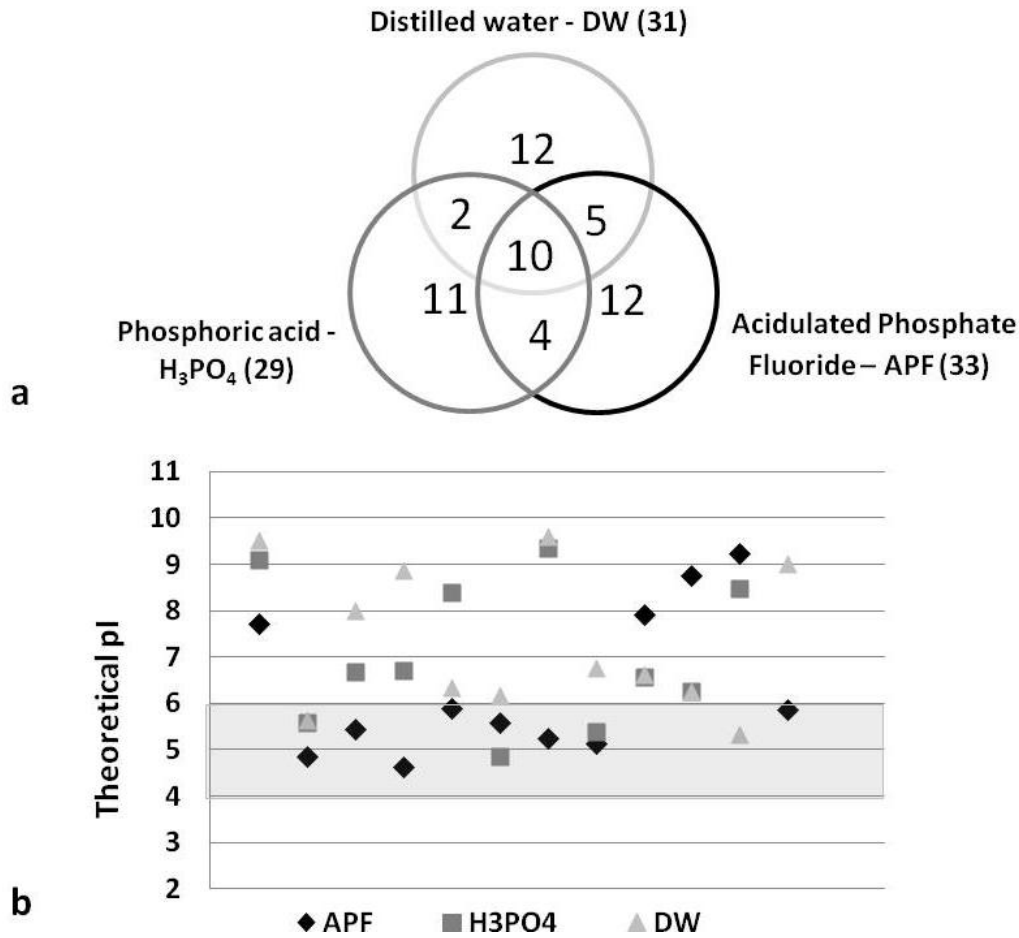


Figure 2. Proteins identified in *in vitro* acquired enamel pellicle. **(a)** Venn diagram shows the number of protein identified among groups treated with DW, H_3PO_4 solution, and APF solution. **(b)** Theoretical pI of the full-length proteins found exclusive in acquired enamel pellicle from each treatment group: DW, H_3PO_4 solution, or APF solution. The area selected in gray shows the proteins with the pI next to the acidic end (<5) of the pI scale, which highlighted that the majority of the proteins were identified in slabs treated with APF.

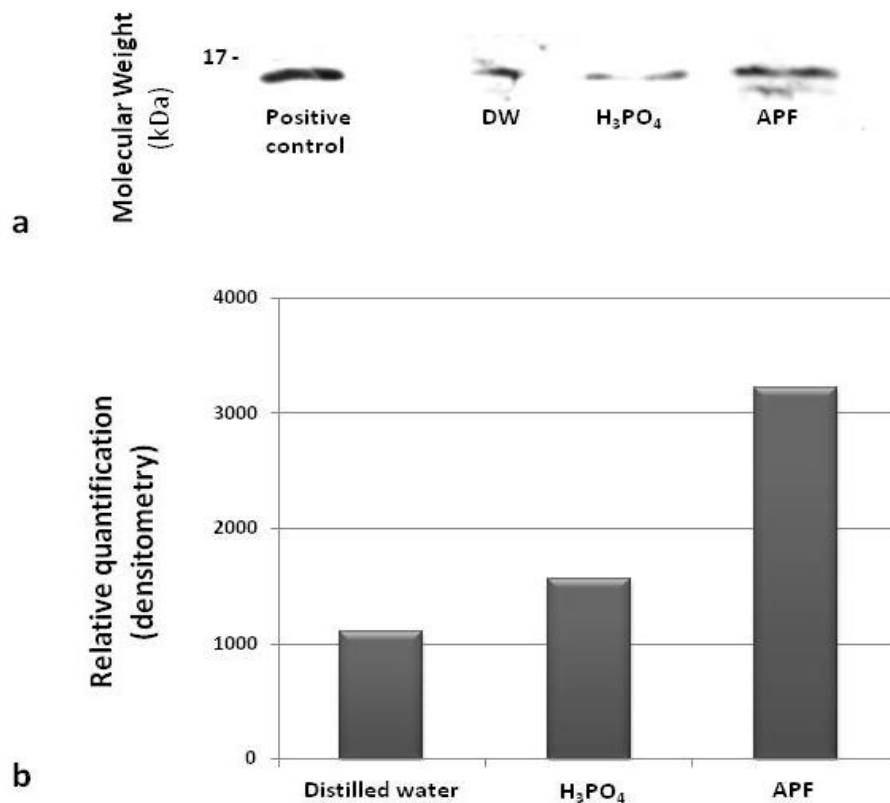


Figure 3. Immunoblotting confirms the higher abundance of S100-A9 on acquired enamel pellicle formed on APF treated enamel. **(a)** Immunoblotting of S100-A9 protein from *in vitro* acquired enamel pellicle in all treatment groups: DW, phosphoric acid solution and APF solution, including a positive control of S100-A9 recombinant protein. Number on the left indicates the molecular mass marker mobility. **(b)** Densitometric analyses of S100-A9 amount in acquired enamel pellicle formed in groups 1, 2 and 3.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A utilização de metodologias baseadas em proteômica, em especial a espectrometria de massas, tem contribuído amplamente para o conhecimento dos componentes proteicos e peptídicos da película salivar adquirida em esmalte (Yao *et al.*, 2001, 2003; Siqueira *et al.*, 2007, 2012; Siqueira & Oppenheim, 2009; Vitorino *et al.*, 2005, 2007). A alta sensibilidade da espectrometria de massas permite a identificação de proteínas com uma grande faixa dinâmica de concentração, o que torna esta técnica altamente adequada para a investigação da composição da película adquirida (Lendenmann *et al.*, 2000).

Apesar de somente recentemente a espectrometria de massas ter sido utilizada para avaliar a influência da aplicação de soluções fluoretadas na composição da película salivar adquirida em blocos de HA (Siqueira *et al.*, 2012), as condições utilizadas não simularam o uso clínico de soluções de alta concentração de flúor. Dessa forma, no presente estudo, avaliou-se a composição da película adquirida formada sobre esmalte tratado previamente com flúor, trazendo novas informações quanto à influência da solução de flúor fosfato acidulado na composição de proteínas da película.

Foram identificadas algumas proteínas como histatina, estaterira e proteína ácida rica em prolina as quais já foram demonstradas estar entre as primeiras proteínas que se adsorvem à HA (Lendenmann *et al.*, 2000; Hannig & Joiner, 2006). Sabe-se que há uma alta dificuldade na identificação dessas proteínas em amostras digeridas com tripsina devido à elevada abundância de resíduos de lisina e arginina na região do N-terminal dessas proteínas gerando peptídeos muito pequenos (Siqueira *et al.*, 2007). Ademais, o alto conteúdo de resíduos de prolina na sequência proteica torna-se também um desafio para a análise por espectrometria de massas, tanto pelo efeito da prolina no espectro gerado quanto por não gerar peptídeos quando o C-terminal dos resíduos de lisina e arginina estão seguidos de resíduos de prolina.

Vale ressaltar que o atual estudo demonstrou, pela primeira vez, uma maior abundância da proteína ligadora de cálcio S100-A9 quando da aplicação de solução fluoretada acidificada. Notavelmente, a presença e abundância da proteína S100 – A9 foram

confirmadas por Western Blot em um experimento independente, realizado nas mesmas condições do primeiro experimento, demonstrando a reprodutibilidade do resultado.

Em resumo, as mudanças encontradas na composição da película salivar deste estudo contribuem para o aumento do conhecimento da influência do uso profissional de soluções fluoretadas na afinidade proteica da película salivar. Os resultados abrem caminho para que estudos sejam conduzidos avaliando o mecanismo de interação das proteínas à superfície de esmalte recoberta por minerais do tipo CaF_2 e, adicionalmente, o impacto destas alterações nas funções biológicas da película adquirida.

CONCLUSÃO

A aplicação de FFA em esmalte, simulando o tempo de aplicação clínica, bem como seu controle ativo, ácido fosfórico alteraram quali-quantitativamente a adsorção das proteínas salivares. Dentre as mudanças encontradas a proteína ligadora de cálcio S100-A9 apresentou-se mais abundante na película salivar quando da aplicação de FFA.

REFERÊNCIAS¹

Arends J, Jongebloed WL. The enamel substrate-characteristics of the enamel surface. *Swed Dent J*. 1977; 1(6): 215-24.

Bennick A. Structural and genetic aspects of proline-rich proteins. *J Dent Res*. 1987; 66(2):457-61.

Brudevold F, DePaola PF. Studies on topically applied acidulated phosphate-fluoride at Forsyth Dental Center. *Dent Clin North Am*. 1966; 299-308.

Brudevold F, McCann HG, Nilsson R, Richardson B, Coklica V. The chemistry of caries inhibition problems and challenges in topical treatments. *J Dent Res*. 1967; 46(1): 37-45.

Cardenas M, Arnebrant T, Rennie A, Fragneto G, Thomas RK, Lindh L. Human saliva forms a complex film structure on alumina surfaces. *Biomacromolecules*. 2007; 8(1): 65-9.

Carlen A, Nikdel K, Wennerberg A, Holmberg K, Olsson J. Surface characteristics and *in vitro* biofilm formation on glass ionomer and composite resin. *Biomaterials*. 2001; 22(5): 481-7.

Cheib Z, Lussi A. Impact of acquired enamel pellicle modification on initial dental erosion. *Caries Res*. 2011; 45(2): 107-12.

Dawes C, Jenkins GN, Tonge CH. The nomenclature of the integuments of the enamel surface of the teeth. *Br Dent J*. 1963; 115:65-8.

Douglas CWI. Bacterial-protein interactions in the oral cavity. *Adv Dent Res*. 1994; 8(2): 254-262.

Edgerton M, Levine MJ. Characterization of acquired denture pellicle from healthy and stomatitis patients. *J Prosthet Dent*. 1992; 68(4): 683-91

Hay DI. The adsorption of salivary proteins by hydroxyapatite and enamel. *Arch Oral Biol*. 1967; 12(8): 937-46.

Hay DI. Some observations on human saliva proteins and their role in the formation of the acquired enamel pellicle. *J Dent Res*. 1969; 48(5): 806-810.

¹ De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseada na norma do International Committee of Medical Journal Editors – Grupo de Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

Hay DI. The interaction of human parotid salivary proteins with hydroxyapatite. Arch Oral Biol. 1973; 18(12): 1517-29.

Hay DI. Fractionation of human parotid salivary proteins and the isolation of an histidine-rich acidic peptide which shows high affinity for hydroxyapatite surfaces. Arch Oral Biol. 1975; 20(9): 553-8.

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

Kolenbrander PE, London J. Adhere today, here tomorrow: oral bacterial adherence. J Bacteriol. 1993; 175(11): 3247-52. Review.

Kolenbrander PE, Andersen RN, Blehert DS, Eglund PG, Foster JS, Palmer RJ Jr. Communication among oral bacteria. Microbiol Mol Biol Rev. 2002; 66(3): 486-505. Review.

Lamkin MS, Arancillo AA, Oppenheim FG. Temporal and compositional characteristics of salivary protein adsorption to hydroxyapatite. J Dent Res 1996; 75(2): 803-8.

Larsen MJ, Jensen SJ. On the properties of fluoride solutions used for topical treatment and mouth rinse. Caries Res. 1986; 20(1): 56-64.

Larsen MJ, Richards A. The influence of saliva on the formation of calcium fluoride-like material on human dental enamel. Caries Res. 2001; 35(1): 57-60

Li J, Helmerhorst EJ, Leone CW, Troxler RF, Yaskell T, Haffajee AD *et al.* Identification of early microbial colonizers in human dental biofilm. J Appl Microbiol. 2004; 97(6): 1311-8

Lindh L, Arnebrant T, Isberg P-E, Glantz P-O. Concentration dependence of adsorption from human whole resting saliva at solid/liquid interfaces: an ellipsometric study. Biofouling. 1999; 14: 189-96.

Marsh PD. Dental plaque as a microbial biofilm. Caries Res. 2004; 38(3): 204-11.

Ogaard B. Effects of fluoride on caries development and progression in vivo. J Dent Res. 1990; 69(Spec Iss): 813-9.

Oppenheim FG, Hay DI, Franzblau C. Proline-rich proteins from human parotid saliva. I. Isolation and partial characterization. Biochem. 1971; 10(23): 4233-8.

Oppenheim FG, Yang YC, Diamond RD, Hyslop D, Offner GD, Troxler RF. The primary structure and functional characterization of the neutral histidine-polypeptide from human parotid secretion. J Biol Chem. 1986; 261(3): 1177-82.

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

Ripa LW. An evaluation of the use of professional (operatorapplied) topical fluorides. J Dent Res 1990; 69(Spec Iss): 786-796.

Saxegaard E, Rølla G. Fluoride acquisition on and in human enamel during topical application in vitro. Scand J Dent Res. 1988; 96(6): 523-35.

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

Sönju T, Rølla G. Chemical analysis of the acquired pellicle formed in two hours on cleaned human teeth *in vivo*. Rate of formation and amino acid analysis. Caries Res. 1973; 7(1): 30-8.

Tabak LA, Levine MJ, Mandel, ID, Ellison SA. Role of salivary mucins in the protection of the oral cavity. J Oral Pathol. 1982; 11(1): 1-17. Review

Van Nieuw Amerongen A, Bolscher JG, Veerman EC. Salivary proteins: protective and diagnostic value in cariology? Caries Res. 2004; 38(3): 247-53. Review

Vacca Smith AM, Bowen W H. In situ studies of pellicle formation on hydroxyapatite discs. Arch Oral Biol. 2000; 45(4): 277-91.

Wellock WD, Brudevold F. A study of acidulated fluoride solutions. II. The caries inhibiting effect of single annual topical applications of an acidic fluoride and phosphate solution. A two year experience. Arch Oral Biol. 1963; 8: 179-82.

Yao Y, Grogan J, Zehnder M, Lendenmann U, Nam B, Wu Z, Costello CE, Oppenheim FG. Compositional analysis of human acquired enamel pellicle by mass spectrometry. Arch Oral Biol 2001; 46(4):293-303.

Vitorino R, Lobo MJ, Duarte JR, Ferrer-Correia AJ, Domingues PM, *et al.* The role of salivary peptides in dental caries. Biomed Chromatogr. 2005; 19(3): 214-22.

Vitorino R, Calheiros-Lobo MJ, Williams J, Ferrer-Correia AJ, Tomer KB, Duarte JA, Domingues PM, Amado FM. Peptidomic analysis of human acquired enamel pellicle. Biomed. Chromatogr. 2007; 21(11): 1107–17.

APENDICE 1 – Blocos de esmalte prontos para tratamento com saliva

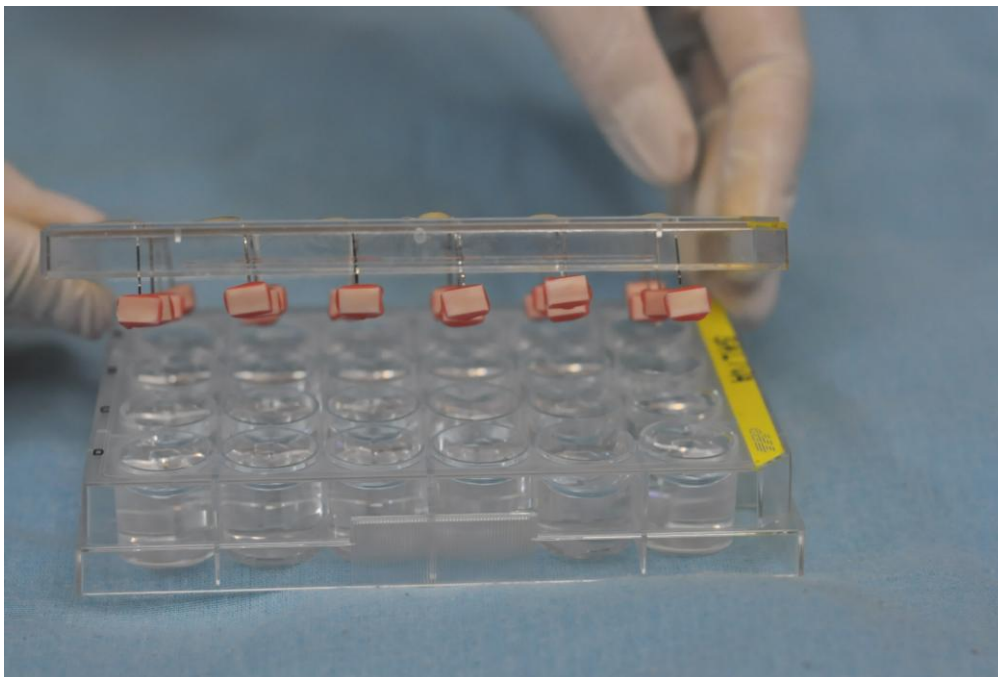


Foto ilustrativa dos blocos de esmalte bovinos isolados com cera 7 e fixados em fios ortodônticos acoplados a placa de poliestireno de 24 poços onde foram realizados o pré-tratamento dos blocos (água destilada, ácido fosfórico ou flúor fosfato acidulado) e a imersão em saliva humana.

ANEXO 2 – Deliberação de defesa de tese em formato alternativo

INFORMAÇÃO CCPG/002/06

Tendo em vista a necessidade de revisão da regulamentação das normas sobre o formato e a impressão das dissertações de mestrado e teses de doutorado e com base no entendimento exarado no Parecer PG nº 1985/96, que trata da possibilidade do formato alternativo ao já estabelecido, a CCPG resolve:

Artigo 1º - O formato padrão das dissertações e teses de mestrado e doutorado da UNICAMP deverão obrigatoriamente conter:

- I. Capa com formato único ou em formato alternativo que deverá conter informações relativas ao nível (mestrado ou doutorado) e à Unidade de defesa, fazendo referência à Universidade Estadual de Campinas, sendo o projeto gráfico das capas definido pela PRPG.
- II. Primeira folha interna dando visibilidade à Universidade, a Unidade de defesa, ao nome do autor, ao título do trabalho, ao número de volumes (quando houver mais de um), ao nível (mestrado ou doutorado), a área de concentração, ao nome do orientador e co-orientador, ao local (cidade) e ao ano de depósito. No seu verso deve constar a ficha catalográfica.
- III. Folha de aprovação, dando visibilidade à Comissão Julgadora com as respectivas assinaturas.
- IV. Resumo em português e em inglês (ambos com no máximo 500 palavras).
- V. Sumário.
- VI. Corpo da dissertação ou tese dividido em tópicos estruturados de modo característico à área de conhecimento.
- VII. Referências, formatadas segundo normas de referenciamento definidas pela CPG da Unidade ou por critério do orientador.
- VIII. Todas as páginas deverão, obrigatoriamente, ser numeradas, inclusive páginas iniciais, divisões de capítulos, encartes, anexos, etc... As páginas iniciais poderão ser numeradas utilizando-se algarismos romanos em sua forma minúscula.
- IX. Todas as páginas com numeração "ímpar" serão impressas como "frente" e todas as páginas com numeração "par" serão impressas como "verso".

§ 1º - A critério do autor e do orientador poderão ser incluídos: dedicatória; agradecimento; epígrafe; lista de: ilustrações, tabelas, abreviaturas e siglas, símbolos; glossário; apêndice; anexos.

§ 2º - A dissertação ou tese deverá ser apresentada na língua portuguesa, com exceção da possibilidade permitida no artigo 2º desta Informação.

§ 3º - As dissertações e teses cujo conteúdo versar sobre pesquisa envolvendo seres humanos, animais ou biossegurança, deverão apresentar anexos os respectivos documentos de aprovação.

Artigo 2º - A critério do orientador e com aprovação da CPG da Unidade, os capítulos e os apêndices poderão conter cópias de artigos de autoria ou de co-autoria do candidato, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, escritos no idioma exigido pelo veículo de divulgação.

§ único - O orientador e o candidato deverão verificar junto às editoras a possibilidade de inclusão dos artigos na dissertação ou tese, em atendimento à legislação que rege o direito autoral, obtendo, se necessária, a competente autorização, deverão assinar declaração de que não estão infringindo o direito autoral transferido à editora.

Artigo 3º - Dependendo da área do conhecimento, a critério do orientador e com aprovação da CPG da Unidade, a dissertação ou tese poderá ser apresentada em formato alternativo, desde que observados os incisos I, II, III, IV, V e VII do artigo 1º.

Artigo 4º - Para impressão, na gráfica da Unicamp, dos exemplares definitivos de dissertações e teses defendidas, deverão ser adotados os seguintes procedimentos:

§ 1º - A solicitação para impressão dos exemplares de dissertações e teses poderá ser encaminhada à gráfica da Unicamp pelas Unidades, que se responsabilizarão pelo pagamento correspondente.

§ 2º - Um original da dissertação ou tese, em versão definitiva, impresso em folha tamanho carta, em uma só face, deve ser encaminhado à gráfica da Unicamp acompanhado do formulário "Requisição de Serviços Gráficos", onde conste o número de exemplares solicitados.

§ 3º - A gráfica da Unicamp imprimirá os exemplares solicitados com capa padrão. Os exemplares solicitados serão retirados pelas Unidades em no máximo, cinco dias úteis para impressão preto e branco e 10 dias úteis para coloridas.

§ 4º - No formulário "Requisição de Serviços Gráficos" deverão estar indicadas as páginas cuja reprodução deva ser feita no padrão "cores" ou "foto", ficando entendido que as demais páginas devam ser reproduzidas no padrão preto/branco comum.

§ 5º - As dissertações e teses serão reproduzidas no padrão frente e verso, exceção feita às páginas iniciais e divisões de capítulos; dissertações e teses com até 100 páginas serão reproduzidas no padrão apenas frente, exceção feita à página que contém a ficha catalográfica.





§ 6º - As páginas fornecidas para inserção deverão ser impressas em sua forma definitiva, ou seja, apenas frente ou frente/verso.

§ 7º - O custo, em reais, de cada exemplar produzido pela gráfica será definido pela Administração Superior da Universidade.

Artigo 5º - É obrigatória a entrega de dois exemplares para homologação.

Artigo 6º - Esta Informação entrará em vigor na data de sua publicação, ficando revogadas as disposições em contrário, principalmente as Informações CCPG 001 e 002/98 e CCPG/001/00.

Campinas, 13 de setembro de 2006

	COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS	
<h2 style="text-align: center;">CERTIFICADO</h2>		
<p>O Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP certifica que o projeto de pesquisa "Análise proteômica da película adquirida salivar formada sobre esmalte e dentina tratados com fluoreto", protocolo nº 007/2010, dos pesquisadores Jaime Aparecido Cury, Adriana Franco Paes Leme e Nádia Masson, satisfaz as exigências do Conselho Nacional de Saúde - Ministério da Saúde para as pesquisas em seres humanos e foi aprovado por este comitê em 17/02/2010.</p>		
<p>The Ethics Committee in Research of the School of Dentistry of Piracicaba - State University of Campinas, certify that the project "proteomic analysis of acquired enamel/dentine pellicle treated with fluoride", register number 007/2010, of Jaime Aparecido Cury, Adriana Franco Paes Leme and Nádia Masson, comply with the recommendations of the National Health Council - Ministry of Health of Brazil for research in human subjects and therefore was approved by this committee at 02/17/2010.</p>		
	Prof. Dr. Pablo Agustín Vargas Secretário CEP/FOP/UNICAMP	
		Prof. Dr. Jacks Jorge Junior Coordenador CEP/FOP/UNICAMP
<p><small>Nota: O título do protocolo aparece como fornecido pelos pesquisadores, sem qualquer edição. Notice: The title of the project appears as provided by the authors, without editing.</small></p>		

ANEXO 3 – Comprovante de submissão de artigo

ScholarOne Manuscripts

23/11/12 17:39

Caries Research

[Edit Account](#) | [Instructions & Forms](#) | [Log Out](#) | [Get Help Now](#)

SCHOLARONE™
Manuscripts

[Main Menu](#) → [Author Dashboard](#) → Submission Confirmation

You are logged in as Adriana Paes Leme

Submission Confirmation

Thank you for submitting your manuscript to *Caries Research*.

Manuscript ID: CRE-2012-Nov-00279

Title: APF application changes the protein composition of human acquired enamel pellicle

Authors: Masson, Nadia
Domingues, Romênia
Cury, Jaime
Paes Leme, Adriana

Date Submitted: 23-Nov-2012