

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

WANESSA BUENO OTTO

**ESTUDO *in vivo* DO PERFIL PROTEICO DA PELÍCULA DENTAL ADQUIRIDA
APÓS O CONSUMO DE BEBIDA A BASE DE SOJA E LEITE BOVINO.**

CURITIBA

2011

WANESSA BUENO OTTO

**ESTUDO *in vivo* DO PERFIL PROTEICO DA PELÍCULA DENTAL ADQUIRIDA
APÓS O CONSUMO DE BEBIDA A BASE DE SOJA E LEITE BOVINO.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, área de concentração Saúde Bucal durante a Infância e Adolescência, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Elaine Machado Benelli

Co-orientador: Prof. Dr. Fabian Calixto Fraiz

CURITIBA

2011

Otto, Wanessa Bueno

Estudo *in vivo* do perfil proteico da película dental adquirida após o consumo de bebida a base de soja e leite bovino / Wanessa Bueno Otto – Curitiba, 2011.
69 f.: il.; 30 cm.

Orientadora: Professora Dra. Elaine Machado Benelli
Dissertação (Mestrado) – Setor de Ciências da Saúde,
Universidade Federal do Paraná, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Área de Concentração: Saúde Bucal durante a Infância e Adolescência

Inclui bibliografia

1. Película dental. 2. Proteínas salivares. 3. Substitutos do leite humano. I. Benelli, Elaine Machado. II. Universidade Federal do Paraná. III. Título.

CDD 617.67

TERMO DE APROVAÇÃO

WANESSA BUENO OTTO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO

ESTUDO *IN VIVO* DO PERFIL PROTEÍCO DA PELÍCULA DENTAL
ADQUIRIDA APÓS O CONSUMO DE BEBIDA A BASE DE SOJA E LEITE
BOVINO

Dissertação aprovada como requisito parcial à obtenção do grau de mestre no Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Área de Concentração em Saúde Bucal durante a Infância e Adolescência, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, pela seguinte Banca Examinadora:

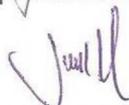
Orientadora:



Prof^a. Dra. Elaine Machado Benelli
Departamento de Bioquímica, UFPR



Prof. Dr. José Miguel Amenábar Céspedes
Departamento de Estomatologia, UFPR



Prof. Dr. Jaime Paba
Departamento de Bioquímica, UFPR

Curitiba, 22 de fevereiro de 2011.

Dedico este trabalho aos meus pais Wilson e Walderez

Aos meus irmãos Rodrigo e Larissa

Ao meu noivo Milton

Por todo apoio, amor e incentivo.

Dedico também a meu querido avô Oldemar (*in memoriam*)

AGRADECIMENTOS

À Deus pela oportunidade de realizar mais uma conquista e pelas pessoas maravilhosas que encontrei em minha jornada;

Aos meus pais Wilson e Walderez e meus irmãos Rodrigo e Larissa, que são meu alicerce, meu porto seguro, minha razão de viver;

Ao meu noivo Milton, que esteve sempre presente, nas horas fáceis e difíceis, dando todo o apoio, compreensão e amor;

À minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Elaine Machado Benelli, pela oportunidade de conhecer a realidade de um estudo laboratorial, com erros, acertos e inúmeros desafios e que me fez enxergar a realidade clínica com olhar de cientista, mas coração de Odontopediatra.

Aos meus grandes Mestres Doutores, do Programa de Pós-Graduação, responsáveis por minha formação desde a graduação;

Aos meus queridos Mestres da Odontopediatria, Prof. Dr. José Vitor Nogara Borges de Menezes, Prof. Dr. Renato Cordeiro Gugisch, Prof.^a Dr.^a Fernanda de Moraes Ferreira e Prof. Dr. Fabian Calixto Fraiz, que são referência e grandes exemplos de mestres, de colegas de profissão e de vida. Sem dúvida, são co-responsáveis pela pessoa que sou hoje, pois levo em minha experiência e em meu modo de ser, um pouco de cada um de vocês. Foram mestres, amigos e muitas vezes meus segundos pais.

Aos meus amigos, que souberam compreender minha ausência;

Às minhas queridas amigas, mestrandas, “cherries”, que foram o apoio de todos os momentos e que eu agradeço a Deus todos os dias por ter colocado essas pessoas maravilhosas em meu caminho;

Às minhas voluntárias que aceitaram participar da pesquisa;

À Patrícia e Beth, alunas do doutorado do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, pela ajuda no laboratório;

À Universidade Federal do Paraná, que se tornou a minha segunda casa e que hoje deixo em busca de novos horizontes.

À Capes, pelo apoio financeiro.

“Sonhe com aquilo que você quiser. Seja o que você quer ser, porque você possui apenas uma vida e nela só se tem uma chance de fazer aquilo que se quer. Tenha felicidade bastante para fazê-la forte. Tristeza para fazê-la humana. E esperança para fazê-la feliz. A felicidade aparece para aqueles que choram. Para aqueles que se machucam. Para aqueles que buscam e tentam sempre. E para aqueles que reconhecem a importância das pessoas que passam por suas vidas.”

Clarice Lispector

RESUMO

O efeito do leite bovino e de bebida a base de soja na formação da película dental adquirida (PDA) foi investigado *in vivo*. Seis voluntárias participaram deste estudo. A película dental adquirida foi formada em presença apenas de saliva (controle), leite bovino e bebida a base de soja. Após 4 horas, as PDA foram coletadas, a análise da composição protéica foi realizada em gel SDS-PAGE a 12% e corados com prata. Os resultados mostraram que os perfis protéicos da saliva e da PDA de um mesmo voluntário, coletados em diferentes dias, são semelhante e que a formação da PDA é específica. Mostram também que o perfil proteico da película dental adquirida controle formada apenas em presença de saliva, difere do perfil protéico das películas dentais adquiridas formadas em presença de leite bovino e bebida a base de soja, em todos os voluntários. Uma proteína de aproximadamente 42 kDa ($\pm 2,28$) foi observada nas películas formadas em presença de leite bovino e bebida a base de soja e não foi detectada na película controle. A partir dos resultados conclui-se que o leite bovino e bebidas a base de soja interferem, especificamente, na composição das proteínas da PDA e que este efeito pode ser observado pelo menos até 4 horas após a ingestão destas bebidas.

Palavras-chave: Película dental. Proteínas salivares. Dieta. Leite de soja. Substitutos do leite humano.

ABSTRACT

The effect of cow milk and soya drinks in the composition of acquired dental pellicle (ADP) was investigated in vivo. Six female volunteers participated of this study. The acquired dental pellicle was formed in the presence of saliva (control), cow milk and soya drink. After 4 hour the rinse, the ADP were collected and the protein composition analyzed by SDS-PAGE 12% gel and silver stained. The results showed that the protein profiles The results showed that the protein profiles of saliva and the ADP of a same subject, collected on different days, are similar and that the formation of ADP is specific. Also show that the protein profile of ADP gained control only formed in the presence of saliva, differs from the protein profile of ADP formed in the presence of cow milk and soya drink, in all volunteers. A protein about 42 kDa (± 2.28) was observed in ADP formed in the presence of cow milk and soya drink and was not detected in the pellicle control. From the results it is concluded that cow's milk and soya drinks interfere specifically in the protein composition of the ADP, and this effect can be observed at least 4 hours after ingestion of these beverages.

Keywords: Dental pellicle. Salivary proteins. Diet. Soy Milk. Breast-milk substitutes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	ESTÁGIOS DE FORMAÇÃO DA PELÍCULA DENTAL ADQUIRIDA	25
Figura 2	PADRÃO DE FORMAÇÃO E MATURAÇÃO DO BIOFILME BUCAL	27
Figura 3	PERFIL PROTEICO DA SALIVA DE UM MESMO VOLUNTÁRIO, EM DIAS DIFERENTES.....	48
Figura 4	PERFIL PROTEICO DA PDA FORMADA EM DIAS DIFERENTES, PARA UM MESMO VOLUNTÁRIO.....	48
Figura 5	PERFIL PROTEICO DAS PELÍCULAS DENTAIS ADQUIRIDAS FORMADAS EM DIFERENTES CONDIÇÕES.....	51
Figura 6	PERFIL PROTÉICO DAS PELÍCULAS DENTAIS ADQUIRIDAS FORMADAS EM DIFERENTES CONDIÇÕES PARA UM MESMO VOLUNTÁRIO EM TRÊS EXPERIMENTOS INDEPENDENTES.....	52

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Quadro 1	COMPOSIÇÃO PROTEICA DA SALIVA E SUAS FUNÇÕES.....	19
Quadro 2	COMPOSIÇÃO PROTEICA DA SALIVA TOTAL E PELÍCULA DENTAL ADQUIRIDA FORMADA A PARTIR DA SECREÇÃO DAS GLÂNDULAS PARÓTIDA E SUBMANDIBULAR E DA SALIVA TOTAL.....	21
Quadro 3	PROTEÍNAS DA PDA, SUAS FUNÇÕES E A RELAÇÃO COM AS BACTÉRIAS DO BIOFILME.....	22
Tabela 1	RELAÇÃO ENTRE PROTEÍNAS DA PDA, COLONIZADORES DO BIOFILME INICIAIS E TARDIOS.....	28
Quadro 4	ESTUDOS QUE RELACIONAM PELÍCULA DENTAL ADQUIRIDA, DIETA E PROCESSOS EROSIVOS.....	30
Quadro 5	RESUMO DOS ESTUDOS SOBRE EFEITO DE COMPONENTES DA DIETA NA COMPOSIÇÃO E FORMAÇÃO DA PELÍCULA.....	32
Quadro 6	MOBILIDADE RELATIVA (R_F) DAS PROTEÍNAS ADICIONALMENTE ENCONTRADAS NAS PELÍCULAS DE BEBIDA A BASE DE SOJA E LEITE BOVINO.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BSA - Albumina do Soro Bovina

CLX - Clorexidine

Eletroforese 2D - eletroforese de duas dimensões

Gtf - Glucosiltransferase

HA - Hidroxiapatita

HMW - Marcador de alto peso molecular

IgG - Imunoglobulina G

IgM - Imunoglobulina M

LMW - Marcador de baixo peso molecular

MALDI - Matrix Assisted Laser Desorption Ionization

MS - Mass Spectrometry

TOF – Time of light

MG1- Mucina 1

MG2- Mucina 2

PE - Película adquirida do esmalte

PRP - Proteína rica em prolina

PRPa - Proteína rica em prolina ácida

PRPb - Proteína rica em prolina básica

PRPg - Glicoproteína rica em prolina

R_f - Mobilidade relativa

SDS - Dodecil sulfato de sódio

PAGE - eletroforese em gel de poliacrilamida

sIgA - Imunoglobulina A secretora

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
1.1 OBJETIVO.....	16
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1 SALIVA.....	17
2.1.1 Composição e Funções.....	17
2.2 PELÍCULA DENTAL ADQUIRIDA.....	20
2.2.1 Composição e Funções.....	20
2.2.2 Padrão de Formação da Película Dental Adquirida.....	24
2.2.3 Padrão Inicial de Formação do Biofilme.....	26
2.2.4 Fatores que Interferem na Composição e formação da Película Dental Adquirida.....	29
<u>2.2.4.1 Interferência da Dieta na Formação e Composição da Película Dental Adquirida.....</u>	<u>30</u>
2.2.4.1.1 <i>Efeito dos Componentes da Dieta na Polaridade da Película Dental Adquirida.....</i>	33
2.2.4.1.2 <i>Efeitos do Leite Bovino e Seus Derivados na Formação e Composição da Película Dental Adquirida.....</i>	33
2.2.4.1.3 <i>Evidências do Efeito do Leite Materno Humano nas Funções da Película Dental Adquirida.....</i>	36
2.2.4.1.4 <i>Efeito dos Polifenóis na Composição e Atividade da Película Dental Adquirida.....</i>	36
2.2.4.1.5 <i>Evidências para o Efeito da Lectina na Função da Película Dental Adquirida.....</i>	39

2.2.4.1.6 Efeito dos Carboidratos na Composição da Película Dental Adquirida.....	40
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	42
3.1 VOLUNTÁRIOS.....	42
3.1.1 Critérios de Inclusão.....	42
3.1.2 Critérios de Exclusão.....	42
3.2 ASPECTOS ÉTICOS.....	42
3.3 BEBIDAS.....	43
3.3.1 Critérios de Inclusão.....	43
3.3.2 Critérios de Exclusão.....	43
3.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	43
3.5 FORMAÇÃO DE PELÍCULA DENTAL ADQUIRIDA.....	44
3.6 COLETA DE SALIVA.....	44
3.7 PREPARO DAS AMOSTRAS DE SALIVA.....	44
3.8 COLETA DA PELÍCULA DENTAL ADQUIRIDA <i>in vivo</i>	45
3.9 PREPARO DAS AMOSTRAS DA PELÍCULA DENTAL ADQUIRIDA.....	45
3.10 PREPARO DAS AMOSTRAS DE SALIVA E PELÍCULA DENTAL ADQUIRIDA E ESTIMATIVA DA QUANTIDADE DE PROTEÍNAS.....	45
3.11 DETERMINAÇÃO DO PERFIL PROTÉICO DAS PELÍCULAS ADQUIRIDAS, SALIVA E BEBIDAS.....	46
3.12 CÁLCULO DA MOBILIDADE RELATIVA (R_f) DAS PROTEÍNAS SEPARADAS POR SDS-PAGE.....	46
4 RESULTADOS.....	48
4.1 PERFIL PROTÉICO SALIVAR E DA PELÍCULA DENTAL	

ADQUIRIDA.....	48
4.2 FORMAÇÃO DA PELÍCULA DENTAL ADQUIRIDA EM DIFERENTES CONDIÇÕES.....	49
5 DISCUSSÃO.....	53
6 CONCLUSÕES.....	60
REFERÊNCIAS.....	61
ANEXO.....	69

1 INTRODUÇÃO

A película dental adquirida (PDA) é um filme orgânico, proteico, acelular, com composição e propriedades únicas, formado pela adsorção seletiva de uma variedade de proteínas e macromoléculas derivadas dos fluidos orais sobre a superfície do esmalte dental, sendo distinta do biofilme bucal (HANNIG; JOINER, 2006; LENDMANN et al., 2000; SIQUEIRA et al., 2007; HARA; ZERO, 2010) que é constituído pelas proteínas da película, por células bacterianas e por matriz intercelular (TEN CATE, 2006).

Dentre os principais componentes identificados estão às proteínas e glicoproteínas, mas também são encontrados carboidratos, lipídios neutros, fosfolipídios e glicolipídios (HANNIG; JOINER, 2006; HARA; ZERO, 2010).

Cada proteína desempenha uma determinada função na película, sendo de grande importância a compreensão do papel deste filme orgânico, assim como a identificação de seus biomarcadores para as doenças cárie e periodontal (HANNIG; JOINER, 2006; SIQUEIRA et al., 2007; VITORINO et al., 2007; HARA; ZERO, 2010). A película dental adquirida forma uma interface protetora entre a superfície dos dentes e a cavidade bucal, reduzindo a fricção e abrasão, agindo como uma barreira semi-permeável que controla os processos de mineralização/desmineralização, modulando a precipitação mineral e a aderência de microrganismos à superfície dental (LENDMANN et al., 2000; HANNIG; JOINER, 2006). Os primeiros colonizadores aderem à superfície dental através de interações específicas entre as bactérias e as proteínas da PDA (HANNIG; JOINER, 2006; KOLENBRANDER et al., 2006; GARCIA-GODOY; HICKS, 2008).

As proteínas precursoras da película derivam de secreções glandulares (glândulas menores, parótidas, submandibulares e linguais) e não glandulares (fluido crevicular, secreções da cavidade nasal, sangue, mucosa e epitélio) que compõem a saliva total (NIEW AMERONGEN et al., 2004). Os componentes dietéticos podem interferir na composição e funções da película modificando seu papel fisiológico (VACCA SMITH; BOWEN, 2000a; VACCA SMITH; BOWEN, 2000b; VAN DER MEI et al., 2002; JOINER et al., 2003; JOINER et al., 2004; PROCTOR et al., 2005; JOINER et al., 2006; DEVOLD et al., 2006; TEIXEIRA et al., 2006;

WERNERSON et al., 2006; TEIXEIRA et al., 2007; HANNIG et al., 2008; HAUKIOJA et al., 2008; DANIELSSON et al., 2009).

As fórmulas infantis a base de soja possuem maior potencial cariogênico que as fórmulas a base de leite bovino (BHAT; DUBEY, 2006; DANCHAIVIJITR et al., 2006; PAPA et al., 2010). Alguns estudos mostram os efeitos protetores do leite em relação a cárie (VACCA SMITH; BOWEN, 1994; NESSER et al., 1994; VACCA SMITH; BOWEN, 1995). Entretanto, nenhum estudo investigou as razões do elevado potencial cariogênico das bebidas a base de soja. Assim, este estudo verificou o efeito do leite bovino e a bebida a base de soja na formação de película dental adquirida.

1.1 OBJETIVO

Esta pesquisa estudou *in vivo* as mudanças ocorridas na composição proteica da película dental adquirida por interferência do leite bovino e bebida a base de soja.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 SALIVA

2.1.1 Composição e Funções

A saliva é um fluido dinâmico, existente na cavidade bucal, formado pelo produto das glândulas salivares maiores (parótida, submandibular e sublingual) e salivares menores, assim como pelo líquido proveniente do fluido gengival e da cavidade nasal (SCHENKELS et al., 1995; NIEW AMERONGEN et al., 2004; HELMERHORST; OPPENHEIM, 2007). É composta por uma parte inorgânica formada pelos íons bicarbonato, fosfato, cálcio e flúor; e uma parte orgânica formada por proteínas, glicoproteínas, peptídeos, enzimas (SCHENKELS et al., 1995; NIEW AMERONGEN et al., 2004).

A principal ação dos componentes inorgânicos é a manutenção da integridade do esmalte. Os componentes orgânicos exercem uma diversidade de funções associadas à microbiota (atividade antifúngica, antiviral e antimicrobiana), a alimentação (digestão, paladar, deglutição), bem como auxiliam na manutenção da integridade do dente (processo de remineralização, inibição da desmineralização, lubrificação, proteção) (NIEW AMERONGEN et al., 2004; HARA; ZERO, 2010).

As proteínas salivares interagem entre si formando complexos distintos, que diferem não somente em estrutura, mas também em função biológica (HELMERHORST; OPPENHEIM, 2007). Os componentes salivares podem interagir com a dieta e modificar a estrutura e composição da saliva (PROCTOR et al., 2005).

A produção proteica varia conforme a glândula em que são secretadas. Mucinas (MG1 e MG2), imunoglobulinas, lactoferrina, catelecina e defensinas originam-se da saliva total. Da glândula parótida originam-se as proteínas glicoproteína rica em prolina (PRPg), Histatina, aglutinina, lisozima e lactoperoxidase. Da glândula submandibular as proteínas cistatina, histatina, aglutinina, lisozima e lactoperoxidase. Cistatina, aglutinina e lisozima são também provenientes das glândulas sublinguais. Em relação aos fatores individuais

relacionados a fluxo salivar, quantidade de fluxo e ritmo circadiano (NIEW AMERONGEN et al., 2004).

Essa produção também varia segundo a idade e o gênero (CABRAS et al., 2009; CASTAGNOLA et al., 2010; FLEISSING et al., 2010; SCARANO et al., 2010).

Os níveis de proteína rica em prolina (PRP) aumentam com a idade, sendo os níveis de proteína rica em prolina básica (PRPb) praticamente indetectáveis em crianças, chegando a níveis semelhantes ao adulto durante a adolescência. Os autores sugerem que níveis mínimos de proteína rica em prolina ácida (PRPa) no grupo de 6-9 anos podem estar associados à transição da dentição decídua para a dentição permanente (dentição mista) onde o processo de esfoliação pode diminuir os níveis destas proteínas. Os níveis de histatina-1, histatina-2 e cistatina S foram detectáveis à partir dos 3 anos de idade (CABRAS et al., 2009).

O perfil protéico da saliva de recém nascidos prematuros também apresenta composição diferente em relação a saliva de adultos. Recém nascidos prematuros apresentam quantidades elevadas de proteínas da família S100 (diferentes isoformas. Proteína relacionada a ligação do cálcio), PRP-3, Cistatina 1 (A e B), antileucoproteinase, T β 4 e T β 10 (timosina), histona, lisozima, α e β globulina (CASTAGNOLA et al., 2010).

No gênero feminino, 6 proteínas são sintetizadas em altos níveis, sendo calgranulina A e transferrina as duas principais. Com o aumento da idade a síntese das proteínas cistatina SN e enolase diminuiu enquanto ocorre um aumento na síntese das proteínas β -actina, transferrina, complemento C3, anidrase carbônica. Entretanto, no gênero masculino 8 proteínas apresentaram síntese diminuída com o aumento da idade: β -actina, prolactina, calgranulina B, cistatina SN, fosfogluconato desidrogenase, anidrase carbônica, Ig- k cadeia leve (FLEISSING et al., 2010).

Algumas das famílias de proteínas que compõem a saliva e suas funções específicas na cavidade bucal estão listadas no QUADRO 1. Entre as principais proteínas encontradas na saliva estão a PRPb (II-2 IB-1), mucinas, amilase, PRPa (trifosforilada, monofosforilada e não-fosforilada), cistatina (S, S1, S2, SA, SN), histatina e algumas proteínas provenientes do fluido crevicular (albumina, α -defensina, cistatina A, estaterina e β -timosina) (SCARANO et al., 2010).

% DAS FAMÍLIAS DE PROTEÍNAS SALIVARES	FAMÍLIAS DE PROTEÍNAS SALIVARES	FUNÇÃO NA CAVIDADE ORAL
20%	Mucinas	Barreira de difusão de prótons na película / agregação bacteriana/ lubrificação / viscoelasticidade / inibe desmineralização / antimicrobiano
20%	Amilases	Digestão do amido
<ul style="list-style-type: none"> • 20% • 12% • 5% 	PRP <ul style="list-style-type: none"> • PRPb • PRPa • PRPg 	Remineralização Adesão bacteriana / remineralização
<ul style="list-style-type: none"> • 8% 	Cistatinas <ul style="list-style-type: none"> • Cistatina S 	Inibidor de protease / antibacteriano / antiviral
6%	Soro Albumina Humana (HSA)	-
<ul style="list-style-type: none"> • 3% • 2% 	Imunoglobulinas <ul style="list-style-type: none"> • IgA • IgG 	Inativa e agrega bactérias / antifúngico e antiviral
1%	Estaterinas	Adesão de bactérias / remineralização
1%	Histatinas	Antibacteriana
Todas as demais (>1200) correspondem a 2% do total	Defensinas	Antibacteriana
	Lactoferrinas	Inibe crescimento bacteriano / antibacteriano
	Lactoperoxidases	Inibe crescimento bacteriano/ antibacteriano
	Lisozimas	Antibacteriano
	Aglutininas	Agregação de bactérias / antibacteriano
	Demais famílias de proteínas	

QUADRO 1 – COMPOSIÇÃO PROTEICA DA SALIVA E SUAS FUNÇÕES.

FONTE: NIEW AMEROGEN et al., 2004; HELMERHOST; OPPENHEIM, 2007; SCARANO et al., 2010.

2.2 PELÍCULA DENTAL ADQUIRIDA

2.2.1 Composição e Funções

A película dental adquirida é uma camada orgânica, acelular, formada pela adsorção de proteínas intactas das secreções glandulares e dos fragmentos proteolíticos resultantes da saliva total. Diversas proteínas degradadas na saliva total têm afinidade pela hidroxiapatita (JENSEN et al., 1992; YAO et al., 2001; YAO et al., 2003).

Vários estudos de proteômica foram realizados para determinar a composição da película dental adquirida. Estes estudos identificaram também proteínas salivares (QUADRO 2) e comprovam a origem proteica da película como sendo glandular e não glandular. As famílias de proteínas da película identificadas incluem PRP, histatina, estaterina, cistatina, albumina, lisozima, mucinas, α -amilase, sIgA, IgG, IgM, anidrase carbônica, lactoferrina, calgranulina B, citoqueratina (JENSEN et al., 1992; SCHUPBACH et al., 2001; YAO et al., 2001; YAO et al., 2003, VITORINO et al., 2004; VITORINO et al., 2007; LI et al., 2003; LI et al., 2004; HELMERHORST; OPPENHEIM, 2007; SIQUEIRA et al., 2007; SIQUEIRA et al., 2009).

Família de Proteínas	Saliva Total	Película da saliva total	Película da parotid	Película da submandibular
Cistatina	(5) (9) (12)	(1) (2) (3) (6) (7) (8) (10) (13)		(1)
Estaterina	(4) (5) (9) (12)	(2) (3) (4) (6) (7) (8) (11) (13)	(1)	(1)
Albumina	(4)	(3) (6) (8) (10) (13)		
A -AMILASE	(4) (5) (9) (12)	(1) (3) (6) (7) (8) (10) (13)	(1)	(1)
Calgranulina b	(4)	(4) (7) (8) (10)		
Histatina	(5) (9) (12)	(2) (4) (6) (7) (11) (13)	(1)	(1)
Lisozima	(5)	(3) (4) (6) (7) (8) (10)		
Citoqueratina		(4) (10) (13)		
Prp	(5) (9) (12)	(1) (2) (3) (6) (7) (8) (11) (13)	(1)	
IgM / igG		(6) (7) (11)		
IgA Secretora		(6) (7) (8) (10)		
Mucina	(5) (9) (12)	(8) (10) (13)		
Lactoferrina	(5)	(3) (6) (8) (10) (13)		
Anidrase carbônica		(6) (7) (8)		
C3/c3c		(6) (10)		
Fibronectina		(10)		

QUADRO 2 – COMPOSIÇÃO PROTEICA DA SALIVA TOTAL E PELÍCULA DENTAL ADQUIRIDA FORMADA A PARTIR DA SECREÇÃO DAS GLÂNDULAS PARÓTIDA E SUBMANDIBULAR E DA SALIVA TOTAL.

FONTES: **(1)** JENSEN et al., 1992; **(2)** LAMKIN et al., 1996; **(3)** YAO et al., 2001; **(4)** YAO et al., 2003; **(5)** NIEW AMEROGEN et al., 2004; **(6)** LI et al., 2004; **(7)** VITORINO et al., 2004; **(8)** HANNIG e JOINER, 2006; **(9)** HELMERHORST e OPPENHEIM, 2007; **(10)** SIQUEIRA et al., 2007; **(11)** VITORINO et al., 2007 **(12)** DAWES et al., 2008; **(13)** SIQUEIRA et al., 2009.

A película dental adquirida tem função lubrificante da superfície dental, na redução da fricção entre os dentes e entre estes e a mucosa bucal, agindo como uma membrana semipermeável, tendo influência no processo de des/remineralização, participação na adesão bacteriana, sendo muito importante na manutenção da integridade do dente, controlando a dissolução dinâmica da superfície do esmalte e conferindo certa resistência e estabilidade as dissoluções químicas e ao ataque por agentes ácidos (LENDEMANN et al., 2000; HANNIG; JOINER, 2006; HARA; ZERO, 2010). O QUADRO 3, resume a função das proteínas identificadas na película e sua relação com a formação de biofilme.

FAMÍLIAS DE PROTEÍNAS	PAPEL FISIOLÓGICO	MICROORGANISMOS ADERIDOS
α -amilase	Digestão do amido	<i>Streptococcus gordonii</i> <i>Streptococcus mitis</i> <i>Streptococcus oralis</i> <i>Streptococcus sanguis</i>
Aglutinina salivar	Aglutinação de bactérias	<i>Streptococcus gordonii</i>
Albumina	Regulação pressão osmótica	-
Anidrase carbônica	Neutralização de ácidos	-
Calgranulina B	Ligação de cálcio	-
Cistatina	Propriedade antibacteriana e antiviral	-
Citoqueratina	Proteína celular	-
Complemento C3	Ativação do sistema complemento	-
Estaterina	Inibidor de precipitação de cálcio	<i>Actinomyces viscosus</i> <i>Fusobacterium nucleatum</i>
Fibrinogenio	Fator 1 da coagulação	<i>Actinomyces naeslundii</i> <i>Fusobacterium nucleatum</i> <i>Porphyromonas gingivalis</i> <i>Streptococcus gordonii</i> <i>Streptococcus mitis</i> <i>Streptococcus oralis</i> <i>Streptococcus sanguis</i>
Fibronectina	Proteína estrutural	<i>Actinomyces naeslundii</i> <i>Fusobacterium nucleatum</i> <i>Porphyromonas gingivalis</i>
Histatina	Efeito antimicrobiano	-
Imunoglobulinas sIgA / sIgM / sIgG	Resposta imune (IgA reage a mutans)	<i>Actinomyces naeslundii</i> <i>Fusobacterium nucleatum</i> <i>Porphyromonas gingivalis</i> <i>Streptococcus sanguis</i>
Lactoferrina	Glicoproteína antibacteriana com propriedades ferro obrigatórias	-
Lisozima	Efeito antibacteriano Lise bacteriana	<i>Streptococcus sanguis</i>
Mucina MG1/MG2	Lubrificação	<i>Streptococcus gordonii</i> <i>Streptococcus mitis</i> <i>Streptococcus mutans</i> <i>Streptococcus oralis</i> <i>Streptococcus sanguiniss</i>
PRP	Precursor da película	<i>Actinomyces naeslundii</i> <i>Actinomyces viscosus</i> <i>Streptococcus gordonii</i> <i>Streptococcus mitis</i> <i>Streptococcus mutans</i> <i>Streptococcus oralis</i>

QUADRO 3 – PROTEÍNAS DA PDA, FUNÇÕES E RELAÇÃO COM AS BACTÉRIAS DO BIOFILME.
FONTE: HANNIG E JOINER, 2006; KOLENBRANDER et al., 2006; HARA et al., 2010.

De acordo com o quadro anterior, a presença simultânea de componentes que promovem a adesão de microrganismo e de componentes inibitórios, indicam a função da película na formação do biofilme e no seu controle, o que mostra a importância de conhecer a composição da PDA e identificar seus biomarcadores para as doenças bucais.

Estudos de proteômica salivar mostram biomarcadores salivares já identificados como os biomarcadores de estresse (cortisol), os possíveis biomarcadores para cárie (estaterina, cistatina S, a proteína salivar CSP-1 e a glicoproteína GP340) e de doença periodontal (metaloproteinases MMP-2, MMP-8 e MMP-9; interleucina-1).

Esse estudos relacionam a importância da identificação desse biomarcadores para um melhor controle das doenças bucais e a busca de indicadores de risco para essas doenças. A análise salivar pode ser de grande importância par o diagnóstico de doenças sistêmicas e tem a vantagem de ser um método pouco invasivo (KAUFMAN; LAMSTER, 2002; MILLER et al., 2006; RAI et al., 2008; HELLHAMMER et al., 2009; RUDNEY et al., 2009; AMBATIPUDI et al., 2010).

2.2.2 Padrão de Formação da Película Dental Adquirida

A película dental adquirida origina-se após a erupção dos dentes, e minutos após a exposição do dente ao meio bucal pode-se detectá-la na superfície do esmalte (LENDMANN et al., 2000). A adsorção de biopolímeros na interface dente-saliva é um processo rápido, que *in vivo* começa em segundos (HANNIG; JOINER, 2006). O mecanismo geral para sua formação envolve interações eletrostáticas entre as proteínas salivares e os grupos carboxila/fosfato da superfície do esmalte, além de interações de van der Waals e hidrofóbicas entre proteínas, contribuindo na formação de várias camadas (HANNIG; JOINER, 2006; VITORINO et al., 2007; HARA; ZERO, 2010).

A formação da película dental adquirida é caracterizada por estágios (FIGURA 1), sendo o primeiro a adsorção espontânea das proteínas da saliva na superfície dental. Os íons cálcio dos cristais de esmalte, em contato com a saliva total, tendem a dissolver. Como resultado, os íons fosfato restantes conferem carga negativa a esta superfície que é então revestida por uma camada de carga positiva dos íons cálcio dissolvidos. Assim, esta superfície eletropositiva interage com as proteínas eletronegativas (HANNIG; JOINER, 2006). Nessa etapa adsorvem instantaneamente as fosfoproteínas com alta afinidade PRP-3, PRP-4 e estaterina, capazes de reagir com os íons cálcio e fosfato do esmalte. Ocorrem interações iônicas, de van der Waals e hidrofóbicas. Na segunda etapa ocorre uma interação mais lenta com a HA e as proteínas que participam desta etapa são a α -amilase, PRP_g e cistatina (LAMKIN et al., 1996; HANNIG; JOINER, 2006). Na terceira etapa ocorre uma contínua adsorção de biopolímeros da saliva (ocorrendo interação entre as proteínas salivares e as proteínas precursoras da película primária), sendo esta uma fase mais complexa, de adsorção rápida, seguida de uma fase mais lenta. As proteínas que participam dessa última etapa são PRP-1, PRP-2 e histatina (LAMKIN et al., 1996; HANNIG; JOINER, 2006). Estudos sugerem que essa fase não atinge seu auge em 2 horas, mostrando que a formação da película dental adquirida não se completa neste tempo (LAMKIN et al., 1996; HANNIG; JOINER, 2006). O equilíbrio ocorre próximo a 2 horas de formação da película e bactérias podem ser encontradas apenas após 4 horas (LENDMANN et al., 2000; HANNIG; JOINER,

2006; HARA; ZERO, 2010). Após a remoção química ou mecânica da película dental adquirida, esta volta a ser formada instantaneamente.

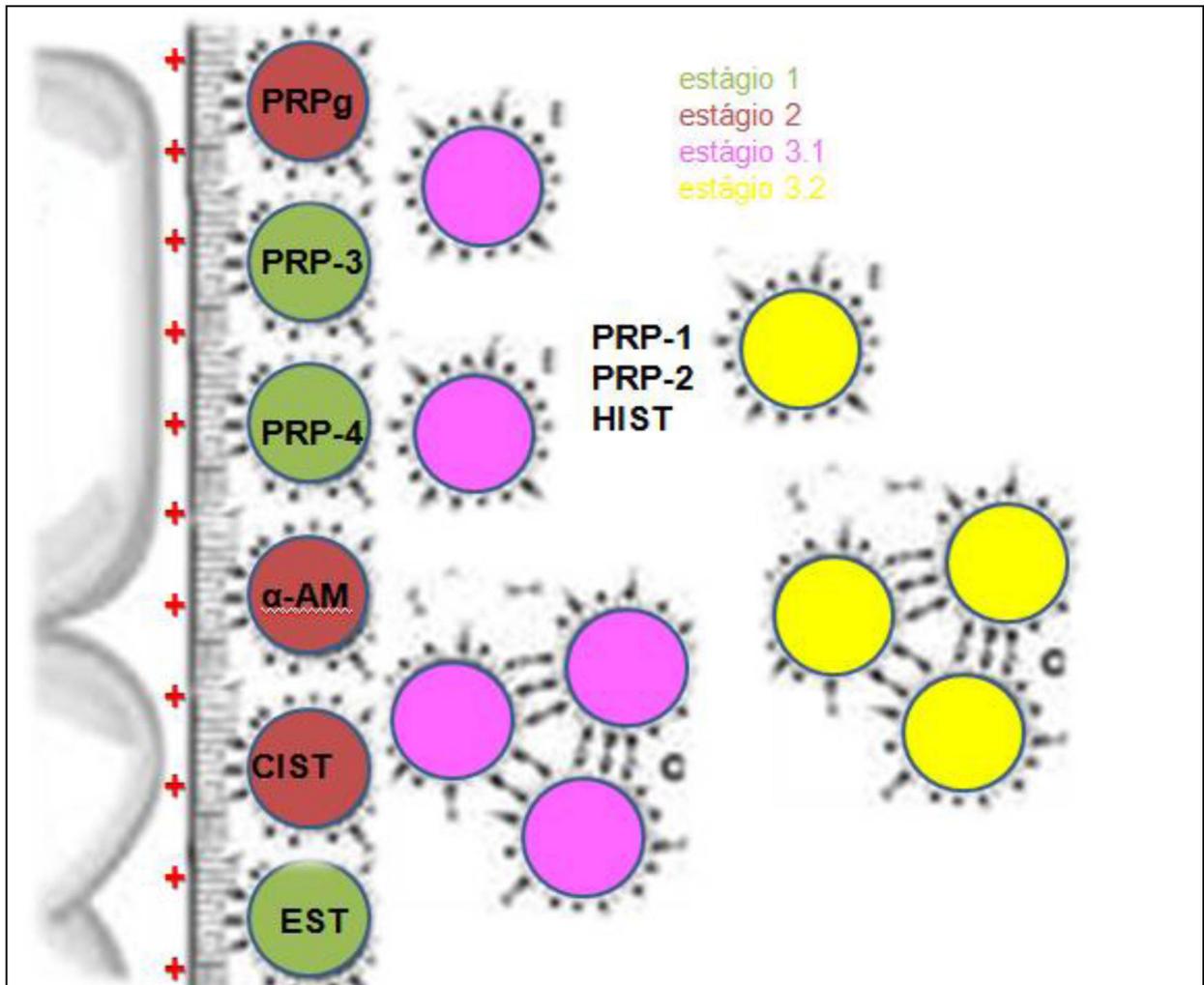


FIGURA 1 – ESTÁGIOS DE FORMAÇÃO DA PELÍCULA DENTAL ADQUIRIDA
FONTE: O AUTOR

A ultra-estrutura da película foi visualizada sendo composta por uma camada básica, homogênea, fina e granular, na película inicial e uma camada densa, globular, contendo estruturas em forma de micelas, na película madura (LENDEMANN et al., 2000; SCHUPBACH et al., 2001; HANNIG; JOINER, 2006; HARA et al., 2010). A aparência ultra-estrutural e espessura da película dental adquirida dependem do local intra-oral e da superfície onde é formada (HANNIG et al., 1999; HANNIG; JOINER, 2006; DEIMLING et al., 2007).

2.2.3 Padrão Inicial de Formação do Biofilme

O biofilme bucal possui propriedades similares a dos demais biofilmes encontrados no corpo humano, sendo uma estrutura heterogênea, composta por aproximadamente 1000 variedades bacterianas aderidas às proteínas da película dental adquirida e interposta por uma matriz extracelular de polissacarídeos (TEN CATE, 2006)

A película dental adquirida serve de base para o desenvolvimento do biofilme bucal. A colonização inicial ocorre pela adesão passiva entre as bactérias salivares e proteínas da película. A estaterina e PRP servem como receptores de ancoragem para os microorganismos que se prendem firmemente à superfície através de forças iônicas, hidrofóbicas, eletrostáticas e de van der Waals (GARCIA-GODOY; HICKS, 2008).

A colonização inicial é então proporcionada pela adesão às proteínas da película dental adquirida, FIGURA 2 (KOLENBRANDER et al., 2006). Após a adesão dos colonizadores iniciais, compostos basicamente por cocos, a placa evolui e começa a aderir novas espécies, em maior proporção são os bacilos Gram-negativos, muitos deles patógenos (ROSAN; LAMONT, 2000). Esse processo de amadurecimento do biofilme ocorre através da co-agregação existente entre os colonizadores iniciais e tardios, permitindo a diversidade bacteriana do biofilme (GARCIA-GODOY; HICKS, 2008). A coagregação é a interação célula-célula e mediada por adesinas (ROSAN; LAMONT, 2000). Na TABELA 1 estão relacionadas proteínas da película dental adquirida e a relação com os colonizadores iniciais e tardios do biofilme dental.

A película dental adquirida serve então como substrato para a adesão bacteriana, iniciando a formação do biofilme. Desta forma alguns componentes salivares são responsáveis pela adesão bacteriana e por controlar o crescimento deste biofilme (QUADRO 3), aumentando ou não seu potencial deletério para os tecidos bucais (GARCIA-GODOY; HICKS, 2008).

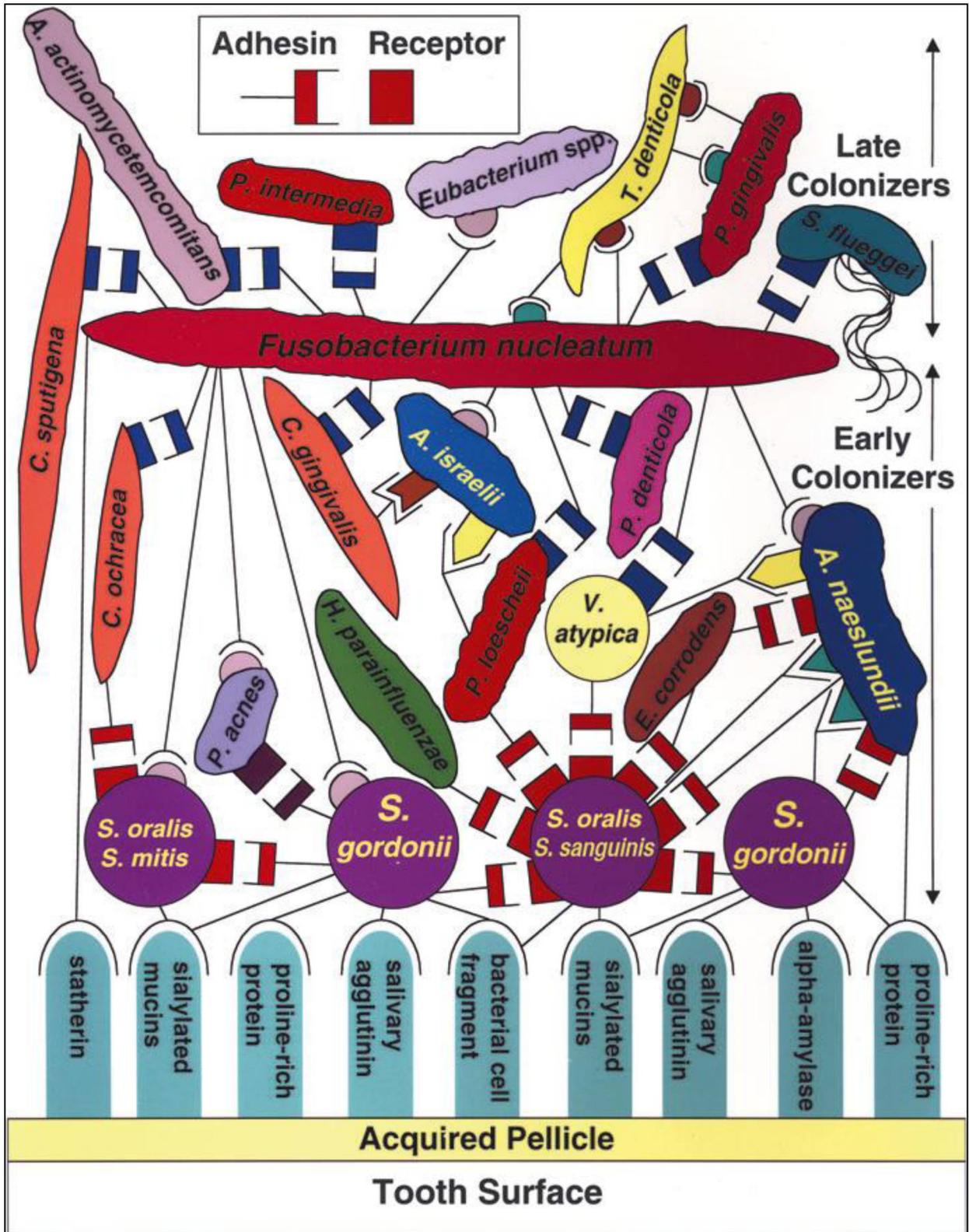


FIGURA 2- PADRÃO DE FORMAÇÃO E MATURAÇÃO DO BIOFILME BUCAL

FONTE: KOLENBRANDER ET AL, 2006

TABELA 1 - RELAÇÃO ENTRE PROTEÍNAS DA PDA, COLONIZADORES DO BIOFILME INICIAIS E TARDIOS.

Proteínas PDA	Colonizadores iniciais	Colonizadores tardios
ESTATERINA	- <i>Fusobacterium nucleatum</i>	- <i>P. gingivalis</i>
PRP	- <i>S. oralis</i> - <i>S. mitis</i> - <i>S. gordonii</i>	- <i>A. naeslundii</i> , <i>C. albicans</i> - <i>P. gingivalis</i> , <i>S. mutans</i> , - <i>A. naeslundii</i> , <i>C. albicans</i> , <i>S. oralis</i> , <i>A. naeslundii</i> , <i>Streptococcus</i> spp
MUCINAS	- <i>S. oralis</i> - <i>S. mitis</i> - <i>S. gordonii</i> - <i>S. sanguinis</i>	- <i>A. naeslundii</i> , <i>C. albicans</i> - <i>P. gingivalis</i> , <i>S. mutans</i> , - <i>A. naeslundii</i> , <i>C. albicans</i> , <i>S. oralis</i> , <i>A. naeslundii</i> , <i>Streptococcus</i> spp - <i>A. naeslundii</i> , <i>C. albicans</i>
AGLUTININAS	- <i>S. gordonii</i>	- <i>A. naeslundii</i> , <i>C. albicans</i> , <i>S. oralis</i> , <i>A. naeslundii</i> , <i>Streptococcus</i> spp
α -AMILASE	- <i>S. gordonii</i>	- <i>A. naeslundii</i> , <i>C. albicans</i> , <i>S. oralis</i> , <i>A. naeslundii</i> , <i>Streptococcus</i> spp

FONTE: KOLENBRANDER et al, 2006; ROSAN e LAMONT, 2000

2.2.4 Fatores que Interferem na Composição e Formação da Película Dental Adquirida

Vários autores relacionam a variação da espessura e composição da película dental adquirida em função da localização na cavidade bucal (AMAECCHI et al., 1999; HANNIG; BALZ, 1999; HANNIG; JOINER, 2006; DEIMLING et al., 2007), entre indivíduos (JENSEN et al., 1992; YAO et al., 2001; FINKE et al., 2002; BRUVO et al., 2009), em relação ao tempo de formação (RYKKE; SONJU, 1991; LAMKIN et al., 1996; AMAECCHI et al., 1999; HANNIG; BALZ, 1999; HANNIG et al., 2003; DEIMLING et al., 2007;) e em relação a dieta (RYKKE; SONJU, 1991; VACCA SMITH; BOWEN, 2000a; VACCA SMITH; BOWEN, 2000b; VAN DER MEI et al., 2002; JOINER et al., 2003; JOINER et al., 2004; PROCTOR et al., 2005; JOINER et al., 2006; DEVOLD et al., 2006; TEIXEIRA et al., 2006; WERNERSSON et al., 2006; TEIXEIRA et al., 2007; HANNIG et al., 2008; HAUKIOJA et al., 2008; DANIELSSON et al., 2009).

Fluxo salivar, estímulo e duração da estimulação da saliva também estão relacionados à formação da PDA (JENSEN et al., 1992; BRUVO et al., 2009). Entretanto, estudos de identificação proteica, *in vivo*, verificaram que o perfil proteico da PDA obtido de um mesmo indivíduo e em três momentos diferentes foram idênticos e reproduzível em quatro indivíduos, indicando que a formação da película dental adquirida consiste em um processo biológico específico (YAO et al., 2001; SIQUEIRA et al., 2007).

Tanto a composição da saliva como a da película podem sofrer mudanças provocadas por variações nas condições bucais (FINKE et al., 2002; SIQUEIRA et al., 2007). A espessura da película varia significativamente nas diferentes regiões dos arcos dentais (sendo mais grossa na superfície lingual posterior inferior e mais fina na superfície palatina superior anterior) e entre os indivíduos. A espessura da camada de película dental adquirida pode ser alterada por bebidas ácidas (FINKE et al., 2002; HANNIG et al., 2003; HARA et al., 2006), podendo ser responsável pelo local específico da erosão dental. Esses dados mostram a função protetora da película em relação à erosão (FINKE et al., 2002; HARA et al., 2006).

2.2.4.1 Interferência da Dieta na formação e Composição da Película Dental Adquirida

Vários estudos relacionam o fator protetor da película dental adquirida e os efeitos erosivos de componentes da dieta (HANNIG; BALZ, 1999; FINKE et al., 2002; NEKRASHEVYCH; STROSSER, 2003; HANNIG et al., 2004; NEKRASHEVYCH et al., 2004; HARA et al., 2006, HANNIG et al., 2007; HANNIG et al., 2009). No QUADRO 4 estão descritos estudos que relacionam película dental adquirida, dieta e processos erosivos.

Tipo de estudo	Dieta	Alteração na PDA	Referência
<i>in situ</i>	ácido cítrico	X	HANNIG e BALZ, 1999
<i>in situ</i>	Groselha Suco laranja	X X	FINKE et al, 2002
<i>in situ</i>	ácido cítrico	X	HANNIG et al, 2003
<i>in vitro</i>	ácido cítrico		NEKRASHEVYCH et al, 2003
<i>in situ</i>	ácido cítrico	X	HANNIG et al, 2004
<i>in vitro</i>	ácido cítrico		NEKRASHEVYCH et al, 2004
<i>in situ</i>	Suco laranja	X	HARA et al, 2006
<i>in situ</i>	ácido clorídrico		HANNIG et al, 2007
<i>in situ</i>	Sprite ligh Coca-cola ligh Suco de laranja	X X X	HANNIG et al, 2009

QUADRO 4 – ESTUDOS QUE RELACIONAM PELÍCULA DENTAL ADQUIRIDA, DIETA E PROCESSOS EROSIVOS.

Um dos primeiros estudos a sugerir os efeitos dos componentes da dieta na composição da película foi o estudo, *in vivo*, realizado por Rykke e Sonju (1991). Nesse estudo a PDA coletada após 24h, sem a ingestão de alimentos, apresentava uma composição semelhante à formada em 2 horas. No entanto, a PDA coletada após 24 horas em presença de dieta normal apresentou características distintas. Essas películas apresentaram um aumento na quantidade de aminoácidos ácidos e neutros, serina, ácido glutâmico e glicina, indicando que a dieta contribui na formação da PDA. No entanto, nenhum aminoácido de origem bacteriana foi detectado.

A dieta pode interferir na composição da PDA e alterar o seu papel fisiológico, podendo influenciar na sucessão ecológica do biofilme dental (VACCA SMITH; BOWEN, 2000a; VACCA SMITH; BOWEN, 2000b; VAN DER MEI et al., 2002; FINKE et al., 2002; LI et al., 2004; TEIXEIRA et al., 2006; WERNERSSON et al., 2006; TEIXEIRA et al., 2007; HAUKIOJA et al., 2008; DANIELSSON et al., 2009) aumentando ou diminuindo a susceptibilidade a cárie, doenças periodontais e erosão (FINKE et al., 2002).

Como pode ser observado no QUADRO 5 a maioria dos estudos que relacionam alterações da composição da película em função de fatores da dieta são estudos *in vitro* e *in situ* (VACCA SMITH; BOWEN, 2000a; VACCA SMITH; BOWEN, 2000b; VAN DER MEI et al., 2002; JOINER et al., 2003; JOINER et al., 2004; PROCTOR et al., 2005; JOINER et al., 2006; DEVOLD et al., 2006; TEIXEIRA et al., 2006; WERNERSSON et al., 2006; TEIXEIRA et al., 2007; HANNIG et al., 2008; HAUKIOJA et al., 2008; DANIELSSON et al., 2009) e apenas o estudo de Rikke e Sonju (1991) foi realizado *in vivo*.

Comparando estudos de análise de composições de aminoácidos entre as películas formadas *in vitro* e *in vivo* podem ser observadas diferenças entre a composição de proteínas. A principal diferença encontrada entre esses estudos mostra a ausência de PRP e menor quantidade de prolina na composição de aminoácidos nas películas *in vivo*. Muitas das principais proteínas identificadas na película *in vitro* são, na verdade, proteínas salivares intactas e sugere-se que a película *in vivo* é uma entidade formada com componentes submetidos a transformações enzimáticas. Portanto, a formação de película *in vitro* não é completamente idêntica da que ocorre na boca *in vivo* (YAO et al., 2001; YAO et al., 2003).

Componentes dietéticos	Delineamento experimental	Fonte de saliva	Tempo de formação	Tempo de exposição aos componentes da dieta	Efeito do estudo	Referências
Dieta normal	<i>In vivo</i>	Saliva total	2 – 24 horas	24 horas	Composição da película	Rikke e Sonju, (1991)
Leite Bovino e κ -casein	<i>in situ</i>	Saliva total	30s - 20 min	30 s	Composição, atividade e estrutura da película	Vacca smith e Bowen, (2000a)
Sacarose, Sorbitol, Xilitol e Tampão fosfato	<i>in situ</i>	Saliva total	30s - 20 min	30 s	Composição da película	Vacca smith e Bowen, (2000b)
Açúcar, Oleo de salada e Leite Bovino	<i>in vitro e in vivo</i>	Saliva total	16h	2 min	Polaridade da película	Van der mei et al., (2002)
Chá Preto, Vinho Tinto (polifenóis)	<i>In vitro</i>	Saliva total	1 h	1 h	Adsorção da película	Joiner et al., (2003)
Chá preto (polifenóis)	<i>In vitro</i>	Saliva total	1 h	30 min	Adsorção da película	Joiner et al., (2004)
Polifenóis	<i>in vitro</i>	Saliva da parotid	1 h	1h	Composição e atividade da película	Proctor et al., (2005)
Leite Bovino e logurte	<i>in vitro</i>	Saliva total	2 h	2 h	Composição da película	Devold et al., (2006)
Chá preto e CLX	<i>In vitro</i>	Saliva total	1 h	1 h	Adsorção da película	Joiner et al., (2006)
Leite Humano	<i>in vitro</i>	Saliva da parotid	1 h	1h	Adsorção da película	Wenersson et al., (2006)
Lectinas de plantas	<i>In vitro</i>	Saliva Total	1 h	1 h	Composição da película	Teixeira et al., (2006)
Lectinas de algas	<i>In vitro</i>	Saliva Total	1h	1h	Composição da película	Teixeira et al., (2007)
Chá Cistus (polifenóis)	<i>In situ</i>	Saliva total	2 h	10 min	Composição e atividade da película	Hannig et al., (2008)
Probiótico	<i>In vitro</i>	Saliva da parotida	1 h	1 h	Composição da película	Haukioja et al., (2008)
Leite Humano	<i>in vitro</i>	Saliva da parotida	1 h	1h	Adsorção da película	Danielson et al, (2009)

QUADRO 5 – RESUMO DOS ESTUDOS SOBRE EFEITO DE COMPONENTES DA DIETA NA COMPOSIÇÃO E FORMAÇÃO DA PELÍCULA
 FONTE: O AUTOR

2.2.4.1.1 Efeito dos Componentes da Dieta na Polaridade da Película Dental Adquirida

A colonização inicial de microrganismos da superfície do esmalte é mediada pela interação entre as adesinas dos microrganismos e proteínas adsorvidas à película. Essas interações específicas podem ser hidrofóbicas ou eletrostáticas e mudanças da polaridade superficial dos dentes podem favorecer ou não a interação de algumas espécies de microorganismo (HANNIG; JOINER, 2006, KOLENBRANDER et al., 2006; GARCIA-GODOY; HICKS, 2008). Os componentes da dieta podem alterar a polaridade da película. Van der Mei e outros (2002) estudaram o efeito de dentifrícios e componentes da dieta na polaridade da película formada *in vitro* e *in vivo*. Inicialmente, os autores avaliaram a polaridade do esmalte *in vivo* e *in vitro* após a escovação. Os resultados mostraram que a película *in vivo* foi mais hidrofóbica que a película formada *in vitro*. Para avaliar se os componentes da dieta interferiram neste efeito, as películas *in vitro* formadas em presença de dentifrícios foram expostas ao leite, açúcar e óleo de salada. O leite bovino e o óleo de salada aumentaram a hidrofobicidade das películas *in vitro* e com a solução de açúcar houve diminuição. Após 6h de exposição adicional à saliva, os efeitos do leite bovino e açúcar desapareceram, embora a película exposta ao óleo de salada continuou hidrofóbica. A película *in vitro* formada a partir da saliva, adicionada a 0,4% de leite bovino diminuiu a adesão de *S. oralis* em relação às películas formadas na ausência dos componentes do leite bovino.

2.2.4.1.2 Efeitos do Leite Bovino e Seus Derivados na Formação e Composição da Película Dental Adquirida

Os efeitos anti-cariogênicos e cariostáticos do leite bovino foram descritos por Bowen e outros (1991) e Warner e outros (2001). Esses efeitos são atribuídos à alta capacidade tampão, às altas concentrações de cálcio e fosfato, assim como a presença de algumas proteínas (α e κ -caseína) que reduzem a adesão do *S. mutans* e a atividade da glucosiltransferase (Gtf) (VACCA SMITH; BOWEN, 1998).

No entanto, α , β e κ -caseínas competem com as proteínas da saliva adsorvidas à HA (VACCA SMITH et al., 1994). Essas proteínas adsorvem a superfície dental simultaneamente à adsorção das proteínas salivares. A ausência de bactérias sugere que o leite bovino desempenha um papel importante na inibição da aderência de microrganismos, explicando em partes o efeito protetor do leite frente aos desafios cariogênicos (VACCA SMITH; BOWEN, 1994; NESSER et al., 1994; VACCA SMITH; BOWEN, 1995).

Um estudo *in situ*, observou o efeito do leite bovino e κ -caseína, em relação ao controle com água, na formação da película dental adquirida, em diferentes tempos (30s, 1, 5, 10 e 20min). Esse estudo analisou o perfil proteico, das amostras formadas nas diferentes condições, por SDS-PAGE 10%. Observou a ultraestrutura da película por microscopia eletrônica de varredura (SEM) e determinou a atividade da glicosiltransferase (Gtf). Este estudo mostrou em seus resultados que a película formada em presença de leite, em relação ao controle com água, apresentou uma quantidade maior de proteínas conforme o tempo de formação e que algumas destas eram de peso molecular diferente aos da película controle, demonstrando um perfil protéico diferente em presença do leite bovino. Os resultados em presença da kappa-caseína apresentaram um perfil protéico também diferente, porém a quantidade das proteínas mostrou-se constante em função do tempo. Os resultados para a atividade da Gtf em presença de leite e κ -caseína apresentaram uma diminuição da atividade na presença desses compostos, sendo que em presença de leite houve redução de 45% e em presença da κ -caseína 67%. Portanto, o consumo de leite pode alterar a composição e formação da película dental adquirida e a redução da atividade da Gtf pode alterar a formação do biofilme dental (VACCA SMITH; BOWEN, 2000a).

Em 2006, Devold e outros, realizaram um estudo *in vitro* para identificar as proteínas do leite bovino e iogurte adsorvidas sobre o esmalte dental. Para tanto, “películas das proteínas do leite” foram formadas com amostras de esmalte dental, obtidas de terceiros molares, incubadas com os produtos do leite bovino: leite desnatado, leite desnatado acidificado (pH 4.6), iogurte comercial e iogurte neutralizado (pH 6.7). Foram obtidos grupos pré-incubados em saliva e grupos incubados apenas nos tratamentos. As incubações prévias em saliva foram realizadas em 2h e posteriormente em 2h nas soluções. E as incubações apenas

com os tratamentos durante 2h. Para a identificação das proteínas realizaram-se análises por eletroforese desnaturante (SDS-PAGE) e posteriormente identificações por espectrometria de massa (MALDI MS). Os resultados obtidos mostraram a presença de caseína como proteína mais abundante na película formada em presença de leite desnatado, porém esta proteína não foi detectada quando em presença do leite desnatado acidificado (pH 4.6). As proteínas mais abundantes na película do leite desnatado acidificado foram as proteínas α -lactoalbumina e β -lactoglobulina. O perfil proteico obtido das amostras incubadas com iogurte foi marcadamente diferente do iogurte neutralizado e dos leites, porém não foi possível a identificação das proteínas do iogurte compondo a película. Isso pode em parte ser explicado pela desnaturação da Albumina do Soro Bovina (BSA) e Lactoferrina durante o tratamento térmico normalmente empregado na fabricação do iogurte. No entanto, esse tratamento térmico não afetou a adsorção de caseínas no iogurte neutralizado. A película do iogurte neutralizado mostrou um perfil protéico semelhante ao da película do leite desnatado. A formação de PDA em presença do leite demonstra ser um processo seletivo de adsorção dependente da dieta e o pH parece ser um fator determinante da adsorção. A presença de película pré-formada não alterou a adsorção de proteínas do leite ao esmalte dental, o que sugere que as mudanças apresentadas por estes estudos *in vitro* e *in situ* podem também simular as condições *in vivo*. Estes resultados confirmam que a dieta teve influência sobre a adsorção de proteínas ao esmalte dental.

O estudo de Haukioja e outros (2008), investigou, *in vitro*, se as bactérias presentes nos probióticos comerciais poderiam afetar a composição da película e a aderência de bactérias. Os pesquisadores utilizaram quatro diferentes probióticos no estudo (*L. rhamnosus* GG, *Lactobacillus casei* Shirota, *L. reuteri* e *Bifidobacterium lactis*) e dois controles (*L. casei* e *Lactococcus lactis*). Os efeitos na adesão de estreptococos à película foram analisados em presença dos probióticos. Todas as cepas estudadas apresentaram efeito significativo sobre a composição protéica da película dental adquirida. A incubação da saliva com grandes quantidades de bactérias, principalmente *L. reuterii* e *B. lactis*, proporcionou a visualização de novas bandas nos géis. Com as cepas de *L. lactis* houve diminuição da banda correspondente à aglutinina salivares. Houve valor reduzido também para a peroxidase salivar, nas películas formadas em presença de probióticos. Com as mudanças ocorridas na película houve redução de adesão de alguns

microrganismos. A aderência do *S. mutans* reduziu significativamente, enquanto a do *S. gordonii* foi menos afetada.

2.2.4.1.3 Evidências do Efeito do Leite Materno Humano nas Funções da Película Dental Adquirida

Wernersson e outros (2006), analisaram em um estudo *in vitro*, a adesão do *S. mutans* à HA, em presença de leite materno. As proteínas do leite capazes de aderir a HA incluem IgA secretora, BSSL (lipase estimulada por sais biliares), lactoferrina, albumina, β -caseína e lisozima. A adesão de *S. mutans* foi analisada em presença de HA revestida por saliva da Parótida e em presença de leite materno. Os resultados apresentados mostraram ocorrer inibição de mais de 40% na adesão *S. mutans*, quando película foi formada em presença de leite materno e saliva simultaneamente. Os autores sugerem que o leite materno interfere na composição da película dental adquirida.

Danielsson e outros (2009) analisaram a ação de proteínas do leite materno na prevenção da adesão de *S. mutans* à HA. A PDA foi formada em presença de saliva e da glicoproteína GP-340, que é o principal receptor para adesão do *S. mutans* presente na saliva. Os resultados mostraram que as proteínas caseína e IgA secretora inibem *S. mutans* e a lactoferrina humana inibe a adesão e agregação de *S. mutans* estirpe *Ingbritt*. Os autores não investigaram a composição da película formada na presença de leite humano, no entanto os resultados sugerem efeito inibitório da adesão de *S. mutans* a película mediada pela ligação da GP340 da película aos componentes do leite.

2.2.4.1.4 Efeito dos Polifenóis na Composição e Atividade da Película Dental Adquirida

Os polifenóis são metabólitos secundários de plantas, formados por um grupo diverso de compostos fenólicos solúveis em água e com grande afinidade por

proteínas. Eles estão divididos em flavonóides, taninos condensados e hidrolisáveis (BENNICK, 2002; SHIMADA, 2006). Os polifenóis têm propriedades antibacterianas e antioxidantes (LUCZAJ; SKRZYDLEWSKA, 2005; KHAN; MUKHTAR, 2007)

Estudos sugerem que componentes da dieta ricos em polifenóis como o chá e vinho tinto podem causar o manchamento dos dentes. Sendo assim, alguns estudos avaliaram o efeito dos polifenóis na formação da película e sua relação com a coloração dentária e adesão bacteriana (LUCZAJ; SKRZYDLEWSKA, 2005; KHAN; MUKHTAR, 2007).

Um estudo conduzido *in vitro*, por Proctor e outros (2005) avaliou a interação de proteínas da saliva com polifenóis presentes no chá preto. Saliva foi incubada com chá, em diferentes volumes, durante 1 hora a 37° C. Realizaram também interações de uma combinação de saliva e HA, incubadas com chá, utilizando o mesmo protocolo. As amostras resultantes desta interação foram analisadas por eletroforese. Os resultados demonstraram a interação de proteínas da saliva com polifenóis do chá preto. A mesma interação pode ser observada quando em presença de HA, formando película dental adquirida. Com este resultado evidenciou-se que os polifenóis do chá preto interagem com as proteínas da saliva, mudando não apenas sua composição e conformação, mas podendo também interagir com a película dental adquirida, mudando sua estrutura e função.

O objetivo do estudo *in situ* realizado por Hannig e outros (2008), foi verificar a influência dos polifenóis do chá Cistus na película e formação inicial do biofilme no período de 120 minutos. Para a análise da atividade enzimática da amilase, lisozima, peroxidase e glucosiltransferase, formaram película dental adquirida nos tempos de 15, 20 e 40 minutos. Para cada um dos tempos, foram analisadas as atividades das enzimas em um grupo controle (apenas com película) e no grupo teste onde foi realizado bochecho com o chá durante 10 minutos posteriormente a formação da película. Após um período mais prolongado, analisaram a presença de bactérias formando o biofilme nos grupos controle e teste, através de técnica de contagem de bactérias (DAPI) e da técnica de *Fish* (método de microscopia fluorescente). Os resultados apresentaram uma pequena redução na aderência de bactérias após o uso do chá contendo polifenóis, o que demonstra um efeito antibacteriano deste composto sobre o biofilme. A atividade enzimática da amilase, lisozima e glucosiltransferase não foram reduzidas, indicando que a película mantém suas propriedades, apesar do efeito antibacteriano. Porém, a atividade da

peroxidase apresentou significativa redução após o enxágüe com chá, demonstrando haver alterações na película dental adquirida em presença desta solução.

Outros estudos utilizando técnica de elipsometria avaliaram a ação de polifenóis na película (JOINER et al., 2003; JOINER et al., 2004; JOINER et al., 2006). No ano de 2003, Joiner e outros, realizaram um estudo *in vitro*, utilizando esta técnica, para acompanhar a formação da película em presença de polifenóis do chá preto e do vinho tinto, investigando as características de adsorção destes componentes. Procuraram avaliar também os posteriores processos de adsorção e desadsorção das proteínas salivares na maturação da película. Formaram PDA por um período de 1 hora. Para a análise por elipsometria, um grupo controle composto por discos HA com película formada a partir de saliva total não estimulada e um grupo teste onde os discos com película foram posteriormente imersos por 1 hora em chá preto. Em seguida, lavaram os discos com tampão e então repetiram as etapas de formação de película imersa em saliva e posterior imersão em chá por mais um momento. Realizaram um experimento análogo com vinho tinto, compondo o segundo grupo teste. Os resultados mostraram uma forte ligação dos componentes do chá e do vinho com as proteínas da película, aumentando sua camada, em espessura. Portanto, estes componentes podem modificar a composição da película dental adquirida em um tempo exagerado de 1 hora de exposição.

Os mesmos autores, no ano de 2004, realizaram outro estudo *in vitro* com elipsometria, avaliando a adsorção de polifenóis do chá e outros polifenóis purificados (epicatequina-3-galato, epigallocatequina-3-galato e teaflavina) e tanino à PDA. Empregaram a mesma metodologia utilizada no estudo anterior (JOINER et al., 2003) para este estudo utilizando chá preto e os polifenóis purificados, formando então 4 grupos teste. Os resultados do tratamento da película com chá preto aumentaram o efeito de adsorção das proteínas, mostrando que esta solução possui um profundo efeito sobre as características físicas da película *in vitro*. Com a adição do epigallocatequina-3-galato também houve aumento da adsorção. Esta modificação foi semelhante, porém em menor escala do que no chá. A adsorção da teaflavina na película é imediata e com a epicatequina-3-galato e epigallocatequina-3-galato a adsorção mostrou-se em menor grau. Porém todos possuem efeito na eluição da película, indicando que podem ser adsorvidos individualmente à película,

mudando suas interações. Os resultados para o tanino também foram os mesmos, mostrando que este também adsorve individualmente a película mudando sua composição (JOINER et al., 2004).

Dois anos mais tarde, esses mesmos autores, utilizando a mesma linha de pesquisa com técnica de elipsometria, objetivaram avaliar a adsorção de componentes do Chá preto e clorexidine a HA e seus efeitos na maturação da película, tendo como consequência o manchamento dos dentes. Nos resultados a presença da CLX aumentou a quantidade adsorvida, porém quando lavada com tampão a adsorção voltou ao normal, diferente do observado pelos outros estudos com os polifenóis onde os compostos permaneciam ligados mesmo após a lavagem com tampões (JOINER et al. 2003 e JOINER et al., 2004). A adsorção dos compostos do chá preto aumenta quando ocorre uma pré-incubação com CLX, explicada pelo fato do aumento das interações eletrostáticas entre a CLX catiônica e os compostos do chá preto carregados negativamente. No entanto, a pré-incubação com chá preto não modificou a interação da CLX. Este estudo demonstra que a CLX aumenta a afinidade do chá preto na película e que ela pode alterar também a composição desta camada orgânica (JOINER et al., 2006).

2.2.4.1.5 Evidências para o Efeito da Lectina na Função da Película Dental Adquirida

A lectina é definida como uma proteína que interage de forma não-covalente com porções de carboidratos, exibindo alta afinidade e especificidade para seus ligantes (RAMOS et al., 2000).

Estudos *in vitro*, com lectina de plantas e lectina de algas, mostraram que estas substâncias se ligam com diferentes afinidades à película. Os resultados mostram também que estes compostos possuem um efeito inibitório para algumas bactérias que formam o biofilme. As seis espécies de lectina de plantas (*Canavalia ensiformis*, *Canavalia brasiliensis*, *Dioclea violacea*, *Dioclea grandiflora*, *Cratylia floribunda*) assim como as duas espécies de lectina de alga estudadas (*Bryothamnion triquetrum* e *Bryothamnion seaforthii*) inibem a adesão dos colonizadores primários do biofilme (*S. oralis*, *S. sanguis* e *S. mitis*) e de espécies

cariogênicas (*S. mutans* e *S. sobrius*) (TEIXEIRA et al., 2006; TEIXEIRA et al., 2007).

2.2.4.1.6 Efeito dos Carboidratos na Composição da Película Dental Adquirida

O estudo *in situ*, realizado no mesmo ano de 2000b, por Vacca Smith e Bowen, determinou a atividade enzimática durante os primeiros minutos de formação da película e também o efeito da dieta em sua formação. Para o experimento discos de HA foram fixados em diferentes regiões intra-buciais. Após realizaram enxágües com sacarose, sorbitol, xilitol, tampão fosfato e água (como controle). PE foi formada durante os tempos 30s, 1, 5, 10 e 20min e o efeito das soluções na PE determinado a partir do número de bandas protéicas detectadas através de imunorreatividade (*Western blots*). Não houve avaliação da densidade das bandas. Os autores determinaram também atividade enzimática da amilase, lisozima e glucosiltransferase. Os resultados da detecção das bandas protéicas mostraram perfis diferentes para cada solução. No controle com água as proteínas lactoferrina e amilase apresentaram imunorreativas em grandes quantidades, bem como carbono anidrase I e II, glicoproteína mucina, cistatina, histatina, estaterina. PRP não foi detectada no grupo controle. A presença da sacarose, sorbitol, xilitol e tampão fosfato tiveram efeito na formação da PE, diferindo da PE controle. Na presença de sacarose observou-se ausência de carbono anidrase I e glicoproteína mucina, além de diminuição da expressão das proteínas PRP e cistatina com ausência de detecção após 1 min. Em presença de sorbitol houve ausência de cistatina SN e mucinas, diminuição da cistatina S com ausência após 1 minuto e presença de PRP. Em relação ao xilitol ausência de lisozima, amilase, carbono anidrase I e II, mucinas, PRP, histatina e presença de lactoferrina após 1 min. E com tampão fosfato ausência de lisozima, amilase, carbono anidrase II, mucina e PRP. O resultado da atividade enzimática mostrou que a amilase e a lisozima saturam a superfície do esmalte após 5 min. Em relação à glucosiltransferase ocorre um decréscimo da atividade após exposição à cavidade bucal. Este estudo pode demonstrar uma deposição distinta das proteínas sobre a superfície do esmalte após a presença destes componentes. Houve ausência e aumento de expressão de

algumas proteínas, modificando o perfil protéico da PDA na presença dos diferentes constituintes da dieta o que pode influenciar também a sucessão microbiana.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 VOLUNTÁRIOS

O estudo contou com a participação de 6 voluntárias, todas do gênero feminino.

3.1.1 Critérios de inclusão

Indivíduos saudáveis, com saúde bucal (sem cárie e doença periodontal), idade entre 20-30 anos, que consentiram voluntariamente com a participação na pesquisa.

3.1.2 Critérios de exclusão

Uso de enxaguatório bucal, medicamentos, drogas ou tabaco.

3.2 ASPECTOS ÉTICOS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR (Projeto 0070.0.091.000-08) e o consentimento informado foi obtido de cada participante.

Todo instrumental utilizado na pesquisa foi previamente esterilizado e armazenado conforme as normas de controle de infecção, sendo o material de consumo descartado.

3.3 BEBIDAS

Neste estudo testou-se os efeitos das bebidas a base de soja (Ades® Original) e leite bovino UHT integral (Tirol®). Para a análise das bebidas em gel de eletroforese, uma amostra de 1mL de cada bebida foi coletada, adicionado inibidor de protease (Protease Inhibitor Cocktail, SIGMA-ALDRICH) e armazenada a -20°C, até a utilização. Não foi adicionado inibidor de protease nas amostras das bebidas (10 mL) utilizadas no bochecho.

3.3.1 Critérios de inclusão

Produção no território brasileiro, disponibilidade em Curitiba – PR, considerando sua armazenagem e validade dentro do tempo de utilização na pesquisa e pH (próximo ao neutro).

3.3.2 Critérios de exclusão

Armazenagem inadequada e prazo de validade incompatível com a execução do experimento.

3.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

A película dental adquirida foi coletada de cada voluntário em três situações diferentes: película de esmalte formada apenas na presença de saliva (G1 - grupo controle); PE formada na presença de bebida a base de soja - Ades® Original (G2) e PE formada na presença de leite bovino (G3). As 6 voluntárias participaram em todos os grupos (G1, G2 e G3).

3.5 FORMAÇÃO DE PELÍCULA DENTAL ADQUIRIDA

Em cada experimento uma profilaxia dental com taça de borracha e pedrapomes foi realizada nos voluntários. Em seguida, uma amostra de saliva foi coletada (item 3.6). Nos grupos teste (G2 e G3) imediatamente após a coleta de saliva, foi realizado bochecho com 10 mL da bebida selecionada (bebida a base de soja ou leite bovino), 2 vezes por 1 minuto. No grupo controle (G1) foi realizado bochecho com 10 mL de água. PDA foi formada nestas condições, durante 4 horas e os participantes privaram-se de comida e bebida durante este período. Para cada condição de formação de película foram realizados no mínimo 2 experimentos independentes e as coletas realizadas sempre no mesmo horário.

3.6 COLETA DE SALIVA

A saliva total não estimulada (1 mL) foi coletada por cuspidela. As amostras foram mantidas em gelo durante todo o procedimento de coleta e inibidor de protease (Protease Inhibitor Cocktail, SIGMA-ALDRICH) foi adicionado.

3.7 PREPARO DAS AMOSTRAS DE SALIVA

Logo após a coleta, as amostras foram centrifugadas a 14000 x g, por 20 minutos, em microcentrífuga, a 4°C, para remoção de materiais insolúveis e restos celulares. O sobrenadante de cada amostra foi coletado e as amostras foram mantidas a - 20 ° C até sua utilização.

3.8 COLETA DA PELÍCULA DENTAL ADQUIRIDA *in vivo*

O procedimento de coleta de PE, *in vivo*, foi realizado conforme descrito por Yao e outros (2003). Após a formação de película (4 horas), os dentes foram isolados com rolos de algodão. A coleta foi realizada com membrana de fluoreto de polivinilideno (Millipore), embebida em 0,5 M tampão bicarbonato de sódio pH 9, friccionando os dois terços oclusal e incisal, das superfícies vestibular e lingual, de incisivo central ao primeiro molar de cada quadrante. Três coletas sucessivas foram feitas na superfície do mesmo dente e as membranas foram colocadas em um mesmo tubo eppendorff de 1,5mL (YAO et al., 2003).

3.9 PREPARO DAS AMOSTRAS DA PELÍCULA DENTAL ADQUIRIDA

As proteínas da película foram recuperadas das membranas Durapore PVDF (Millipore) em 1 ml solução A (50mM Tris-HCl pH 8, 50mM NaCl e inibidor de protease). A extração das proteínas foi realizada por agitação da amostra em homogenizador do tipo vórtex por 60s, seguido de sonicação 5 ciclos de 30 s, alternados com ciclos de 30 s de descanso (Ultrasonic Processor, Cole-Parmer). Em seguida, as amostras foram centrifugadas durante 3 minutos a 4°C, os sobrenadantes transferidos para outro tubo e armazenados a -20°C. Estas amostras foram liofilizadas e posteriormente ressuspensas em solução A.

3.10 PREPARO DAS AMOSTRAS DE SALIVA E PELÍCULA DENTAL ADQUIRIDA E ESTIMATIVA DA QUANTIDADE DE PROTEÍNAS

As amostras de Saliva e Películas (G1, G2 e G3) foram tratadas com o SDS-PAGE Clean-Up Kit (GE-Healthcare Bio Science Corp). As amostras foram ressuspensas em água MilliQ e a quantidade de proteínas totais foi determinada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). A quantificação protéica das bebidas

(bebida a base de soja e leite bovino) também foi realizada pelo método de Bradford.

3.11 DETERMINAÇÃO DO PERFIL PROTÉICO DAS PELÍCULAS ADQUIRIDAS, SALIVA E BEBIDAS

O perfil protéico das amostras de salivas totais, bebidas selecionadas e películas adquiridas formadas em diferentes condições experimentais foi determinado por SDS-PAGE 12%, a 200V e tempo de corrida 80 min. As proteínas contidas nos géis foram reveladas usando coloração com prata.

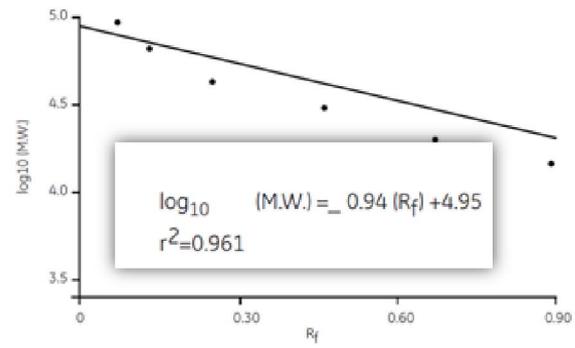
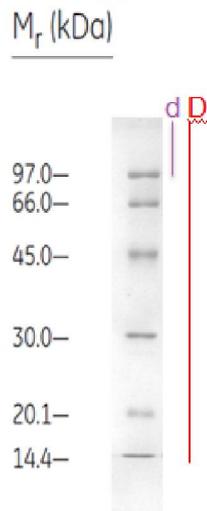
3.12 CÁLCULO DA MOBILIDADE RELATIVA (R_f) DAS PROTEÍNAS SEPARADAS POR SDS-PAGE

O R_f foi calculado conforme instruções do fabricante (Amersham Low Molecular Weight Calibration Kit for SDS Electrophoresis - GE Healthcare Bio Science Corp).

$R_f = d/D$, onde o “d” corresponde a distância do início da corrida até a banda em questão e “D” distância do início até o fronte.

Após calculado o R_f para as bandas do marcador, foi obtida uma curva de calibração e a partir da equação da curva, obtida a massa molecular aproximada, referente ao R_f encontrado para a banda desejada.

Exemplo:



$$R_f = \frac{d}{D}$$

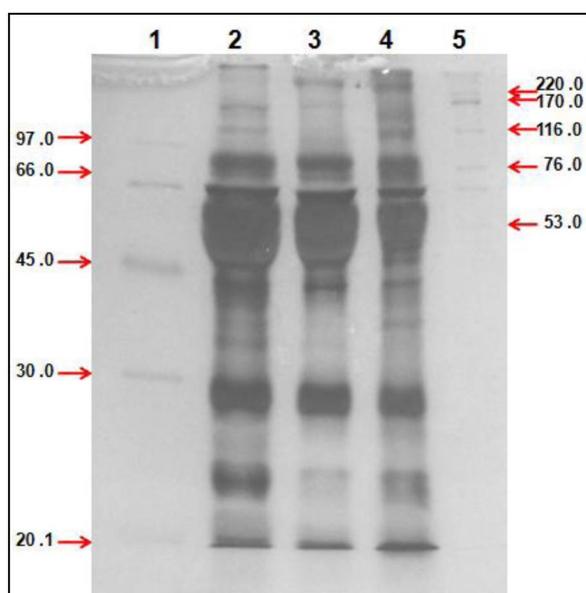
Amersham Low Molecular Weight Calibration Kit for SDS Electrophoresis – GE Healthcare

4 RESULTADOS

4.1 PERFIL PROTÉICO SALIVAR E DA PELÍCULA DENTAL ADQUIRIDA

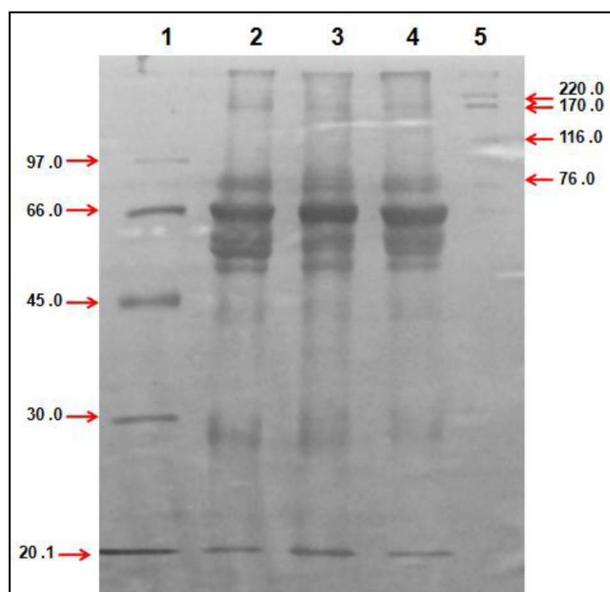
O perfil proteico da saliva (FIGURA 3) e da película (FIGURA 4) de um mesmo voluntário, coletados em diferentes dias. Os resultados mostram que ambos os perfis são semelhante e que a formação da película é específica.

FIGURA 3 PERFIL PROTÉICO DA SALIVA DE UM MESMO VOLUNTÁRIO, EM DIAS DIFERENTES.



Linha 1 – marcador LMW (GE Heathcare);
Linha 2 - Saliva voluntário 1, momento 1;
Linha 3 - Saliva voluntário 1, momento 2;
Linha 4 - Saliva voluntário 1, momento 3;
Linha 5 - marcador HMW (GE Heathcare).

FIGURA 4 PERFIL PROTÉICO DA PDA FORMADA EM DIAS DIFERENTES, PARA UM MESMO VOLUNTÁRIO.



Linha 1 – marcador LMW (GE Heathcare);
Linha 2 – G1, voluntário 1, momento 1;
Linha 3 – G1, voluntário 1, momento 2;
Linha 4 – G1, voluntário 1, momento 3;
Linha 5 - marcador HMW (GE Heathcare).

4.2 FORMAÇÃO DA PELÍCULA DENTAL ADQUIRIDA EM DIFERENTES CONDIÇÕES

Os resultados mostram que o perfil proteico da película controle formada apenas em presença de saliva, difere do perfil protéico das películas formadas em presença de leite bovino e bebida a base de soja, em todos os voluntários (FIGURA 5). Uma banda de aproximadamente 42.72 KDa (QUADRO 6) apareceu nas amostras de películas do grupo G2 e G3, sendo ausente na película G1. Esta banda não apareceu na película formada em presença apenas de saliva, em todos os voluntários. Na figura 5d, linha PL observamos que a banda de 42.72 kDa não é observada. Entretanto, a baixa quantidade desta proteína e alargamento da amostra desta linha durante a corrida podem ter contribuído para este resultado.

Os valores de R_f encontradas para a banda controle foram os mesmos, 67.19 (± 4.8), nas diferentes condições (G1), (G2) e (G3), mostrando que variações ocorrem entre os géis, para uma mesma proteína em todas as amostras. Entretanto, em um mesmo gel os valores calculados para cada banda foram os mesmos. Como o calculo do R_f é uma aproximação, o fato das proteínas adicionais encontradas e G2 e G3 serem semelhantes, não significa que possuam a mesma massa.

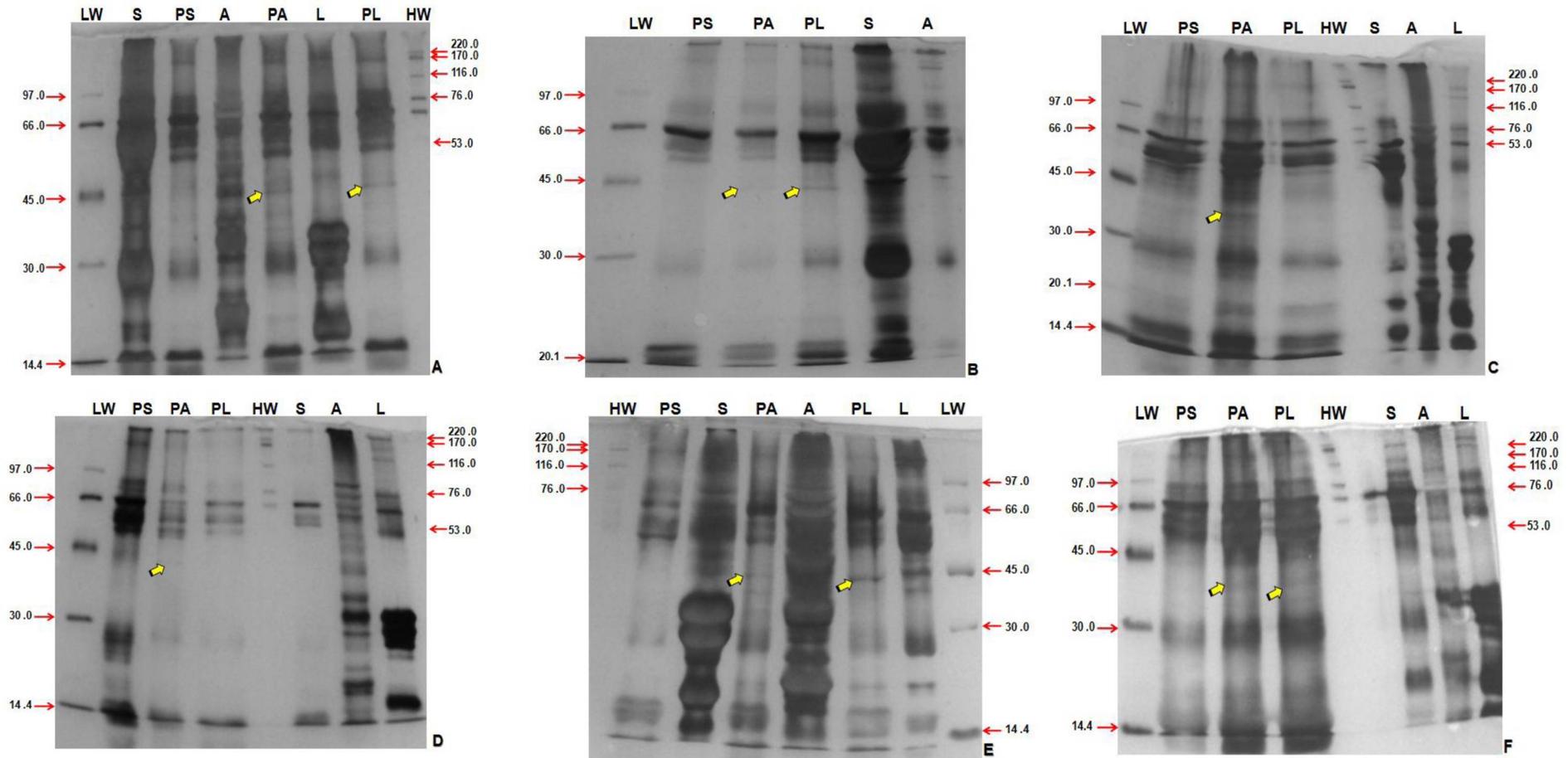
Voluntário	R_f (G2)	R_f (G3)	R_f de uma mesma banda controle		
			R_f (G1)	R_f (G2)	R_f (G3)
A1	42.65	42.65	58.88	58.88	58.88
A2	43.65	43.65	70.79	70.79	70.79
A3	43.65	43.65	64.56	64.56	64.56
B	44.66	44.66	61.65	61.65	61.65
C	39.08	39.08	67.60	67.60	67.60
D	44.66	44.66	70.79	70.79	70.79
E	44.66	44.66	69.18	69.18	69.18
F	39.81	39.81	74.13	74.13	74.13
Média (\pm DP)	42.72 (2.28)	42.72 (2.28)	67.19 (4.8)	67.19 (4.8)	67.19 (4.8)

QUADRO 6 – MOBILIDADE RELATIVA (R_f) DAS PROTEÍNAS ADICIONALMENTE ENCONTRADAS NAS PELÍCULAS DE BEBIDAS A BASE DE SOJA E LEITE BOVINO
 FONTE: O AUTOR

G1 (película de saliva); G2 (película de bebida a base de soja); G3 (película de leite)

Para cada condição de formação de película foram realizados no mínimo 2 experimentos independentes (FIGURA 6). Nesta figura podemos observar que o perfil proteico da película controle formada em presença de saliva é semelhante em todos os voluntários, mostrando que o perfil proteico das películas formadas em uma mesma condição é reprodutível, em dias diferentes. Além disso, o perfil proteico das películas formadas em presença de leite bovino e bebida a base de soja em todos os voluntários foram semelhantes entre si e diferem do perfil proteico da película controle (FIGURA 5). Estes resultados mostram que não só a película formada na presença de saliva, porém as formadas em presença das bebidas selecionadas foram depositadas de forma específica sobre a superfície do esmalte.

FIGURA 5 PERFIL PROTÉICO DAS PELÍCULAS DENTAIS ADQUIRIDAS FORMADAS EM DIFERENTES CONDIÇÕES.



➡ A seta indica as bandas distintas que aparecem nas películas de bebida a base de soja e leite bovino e que não aparecem na película controle;

LW = marcador LMW (GE Healthcare);
A = bebida a base de soja;

HW = marcador HMW (GE Healthcare);
PA = película bebida a base de soja;

S = saliva;
L = leite bovino;

PS = película de saliva;
PL = película de leite bovino;

A) Voluntário1;

B) Voluntário2;

C) Voluntário3;

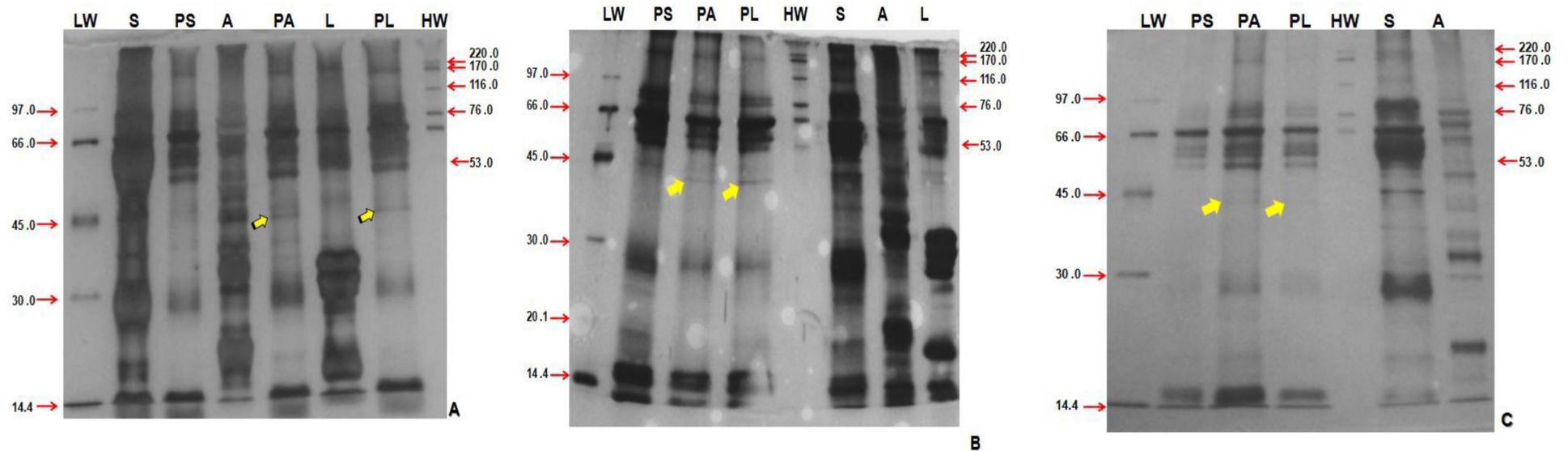
E) Voluntário 5;

F) Voluntário 6.

D) Voluntário 4;

Na Figura 6 pode-se observar que os resultados repetem-se em um mesmo voluntário em três experimentos independentes.

FIGURA 6 PERFIL PROTÉICO DAS PELÍCULAS DENTAIS ADQUIRIDAS FORMADAS EM DIFERENTES CONDIÇÕES PARA UM MESMO VOLUNTÁRIO EM TRÊS EXPERIMENTOS INDEPENDENTES.



➡ A seta indica as bandas distintas que aparecem nas películas de bebidas a base de soja e leite bovino e que não aparece na película controle.

LW = marcador LMW (GE Healthcare);
A = bebida a base de soja;

HW = marcador HMW (GE Healthcare);
PA = película de bebida a base de soja;

S = saliva;
L = leite bovino;

PS = película de saliva;
PL = película de leite bovino.

A) Experimento 1;

B) Experimento 2;

C) Experimento 3.

5 DISCUSSÃO

É de grande importância a compreensão da composição e estrutura da película dental adquirida, bem como as alterações ocorridas frente aos diversos fatores como a localização na cavidade bucal (AMAECCHI et al., 1999; HANNIG; BALZ, 1999; HANNIG; JOINER, 2006; DEIMLING et al., 2007), em relação ao tempo de formação (RYKKE; SONJU, 1991; LAMKIN et al., 1996; AMAECCHI et al., 1999; HANNIG; BALZ, 1999; HANNIG et al., 2003; DEIMLING et al., 2007;) e em relação a dieta (RYKKE; SONJU, 1991; VACCA SMITH; BOWEN, 2000a; VACCA SMITH; BOWEN, 2000b; VAN DER MEI et al., 2002; JOINER et al., 2003; JOINER et al., 2004; PROCTOR et al., 2005; JOINER et al., 2006; DEVOLD et al., 2006; TEIXEIRA et al., 2006; WERNERSSON et al., 2006; TEIXEIRA et al., 2007; HANNIG et al., 2008; HAUKIOJA et al., 2008; DANIELSSON et al., 2009). Suas funções estão relacionadas à composição proteica e cada proteína desempenha uma função específica na PDA (HANNIG; JOINER, 2006; SIQUEIRA et al., 2007; VITORINO et al., 2007; HARA; ZERO, 2010)

Uma das principais funções da PDA está relacionada à formação do biofilme, servindo de base para a adesão dos colonizadores iniciais. Mudanças em sua estrutura e composição determinarão mudanças na formação e composição do biofilme, sendo responsável pelo aumento ou diminuição da suscetibilidade à cárie e doenças periodontais (LENDENMANN et al., 2000; LI et al., 2004; HANNIG; JOINER, 2006; KOLENBRANDER et al., 2006; HARA; ZERO, 2010).

Um dos fatores responsáveis por alterações na película dental adquirida é a dieta. Vários estudos mostram as mudanças ocorridas por interferência dos componentes dietéticos. Esses estudos são os relacionados às interferências na espessura da PDA, provocada por alimentos ácidos e, conseqüentemente, aumentam os fatores relacionados à erosão, diminuindo a proteção da película frente a esses fatores (HANNIG; BALZ, 1999; FINKE et al., 2002; NEKRASHEVYCH; STROSSER, 2003; HANNIG et al., 2004; NEKRASHEVYCH et al., 2004; HARA et al., 2006, HANNIG et al., 2007; HANNIG et al., 2009). E também os estudos relacionados à interferência na composição da PDA (quadro 5), tendo efeitos na atividade, estrutura e polaridade da película dental adquirida, na adsorção de suas proteínas, mudando as funções biológicas e podendo influenciar na

formação do biofilme dental (RYKKE; SONJU, 1991; VACCA SMITH; BOWEN, 2000a; VACCA SMITH; BOWEN, 2000b; VAN DER MEI et al., 2002; JOINER et al., 2003; JOINER et al., 2004; PROCTOR et al., 2005; JOINER et al., 2006; DEVOLD et al., 2006; TEIXEIRA et al., 2006; WERNERSSON et al., 2006; TEIXEIRA et al., 2007; HANNIG et al., 2008; HAUKIOJA et al., 2008; DANIELSSON et al., 2009).

A maioria dos estudos realizados é *in vitro* e *in situ* (VACCA SMITH; BOWEN, 2000a; VACCA SMITH; BOWEN, 2000b; VAN DER MEI et al., 2002; JOINER et al., 2003; JOINER et al., 2004; PROCTOR et al., 2005; JOINER et al., 2006; DEVOLD et al., 2006; TEIXEIRA et al., 2006; WERNERSSON et al., 2006; TEIXEIRA et al., 2007; HANNIG et al., 2008; HAUKIOJA et al., 2008; DANIELSSON et al., 2009) e apenas um deles realizou análise *in vivo* (RYKKE; SONJU, 1991). Estudos da composição proteica entre película dental adquirida formada *in vitro* e *in vivo* mostraram haver diferenças. A PDA formada *in vivo* é resultado da adsorção de componentes submetidos a transformações enzimáticas e, portanto, difere da *in vitro*, onde proteínas intactas adsorvem à superfície dental (YAO et al., 2001; YAO et al., 2003). Este estudo observou *in vivo*, o perfil proteico da película dental adquirida, formada em diferentes condições.

Apesar das diferenças encontradas na composição proteica da saliva em relação a glândula em que é secretada, além das variações entre indivíduos e intra-individuais (NIEW AMERONGEN et al., 2004; CABRAS et al., 2009; CASTAGNOLA et al., 2010; FLEISSING et al., 2010; SCARANO et al., 2010), os resultados *in vivo* para o padrão proteico da PDA obtidos de um mesmo indivíduo, em três momentos diferentes, foram idênticos, bem como a semelhança encontrada entre o perfil proteico de diferentes voluntários (YAO et al., 2001; SIQUEIRA et al., 2007). Esses resultados também puderam ser observados no atual estudo, tanto em relação ao perfil proteico intra-individual da saliva (FIGURA 3) e da película dental adquirida (FIGURA 4), quanto em relação ao padrão de formação da película inter-individual (FIGURA 5), mostrando que o perfil proteico das PDA, formadas em uma mesma condição, é reprodutivo, sendo um processo biológico específico. No estudo, procurou-se fazer as coletas sempre no mesmo horário evitando assim, influência do ritmo circadiano.

O processo de adsorção das proteínas à HA na formação da PDA atinge um equilíbrio próximo de 2 horas, porém continua sua maturação até o início de

formação do biofilme, período de 4 horas (LENDMANN et al., 2000; HANNIG; JOINER, 2006; HARA; ZERO, 2010).

A maior parte dos estudos observou a influência de componentes da dieta em curto prazo, período de 0 a 20 min (VACCA SMITH; BOWEN, 2000a; VACCA SMITH; BOWEN, 2000b) e alguns em no máximo 2 horas (JOINER et al., 2003; JOINER et al., 2004; PROCTOR et al., 2005; DEVOLD et al., 2006; JOINER et al., 2006; TEIXEIRA et al., 2006; WERNERSSON et al., 2006; TEIXEIRA et al., 2007; HANNIG et al., 2008; HAUKIOJA et al., 2008; DANIELSSON et al., 2009). As películas formadas neste estudo foram coletadas após 4 horas do início de sua formação, para verificar a retentividade dos componentes do leite bovino e bebida a base de soja após o período de maturação e início do período de formação do biofilme. A intenção foi mostrar através dos resultados deste estudo, se as alterações provocadas pelas bebidas permanecem até o início da formação do biofilme, podendo sugerir mudanças na adesão das bactérias.

Outra diferença em relação a este estudo foi o tempo de exposição aos produtos da dieta. Os estudos anteriores não conseguiram simular o que acontece *in vivo*, pois o tempo de exposição aos componentes da dieta variou entre 30s e 1 hora ((VACCA SMITH; BOWEN, 2000a; VACCA SMITH; BOWEN, 2000b; JOINER et al., 2003; JOINER et al., 2004; PROCTOR et al., 2005; DEVOLD et al., 2006; JOINER et al., 2006; TEIXEIRA et al., 2006; WERNERSSON et al., 2006; TEIXEIRA et al., 2007; HANNIG et al., 2008; HAUKIOJA et al., 2008; DANIELSSON et al., 2009), sendo que o estudo de Devold e outros (2006) realizou incubação de 2 horas, o que é incompatível com o que acontece na cavidade bucal. O presente estudo buscou simular as condições dinâmicas da ingestão das bebidas, seguida da formação da película em presença de saliva total simultaneamente com as proteínas presentes nas bebidas.

Resultados de estudos mostram que o consumo de fórmulas infantis a base de leite e de soja, tem potencial para indução de desmineralização dos dentes decíduos, principalmente se acrescidas de açúcar (PAPA et al., 2010), porém nenhum estudo mostrou evidências de potenciais cariogênicos das bebidas a base de soja . Outros estudos mostram os efeitos protetores do leite em relação a doença cárie (VACCA SMITH; BOWEN, 1994; NESSER et al., 1994; VACCA SMITH; BOWEN, 1995). A formação da película é um processo seletivo de adsorção dependente da dieta e o pH pareceu ser um fator importante (DEVOLD et al., 2006).

Frente aos resultados apresentados nos estudos (VACCA SMITH; BOWEN, 1994; NESSER et al., 1994; VACCA SMITH; BOWEN, 1995; DEVOLD et al., 2006; PAPA et al., 2010) , o presente estudo selecionou o leite bovino e a bebida a base de soja por apresentarem pH próximo ao neutro e por serem bebidas com fatores influentes nos processos cariosos. Outras bebidas a base de soja adicionadas de frutas não foram utilizadas neste estudo, devido ao pH baixo (MERCÊS et al., 2009), pois o foco do estudo não foi discutir os processos erosivos causados à PDA pelo baixo pH destas bebidas.

Os estudos que observaram variação da composição da película estão representados no QUADRO 5. Assim como os resultados desses estudos mostraram a influência de diferentes componentes da dieta na PDA, pode-se observar nos resultados que o perfil proteico das películas formadas em presença de leite bovino e bebida a base de soja diferem do perfil proteico da película controle (FIGURA 5) e em todos os voluntários este resultado foi semelhante, mostrando a reprodutibilidade dos achados.

Um dos primeiros estudos *in vivo* que analisou a interferência da dieta na película, mostrou que a dieta do indivíduo interfere na composição de aminoácidos da película após 24 horas da ingestão de dieta normal (RYKKE; SONJU, 1991). No entanto, esse estudo analisou apenas a composição de aminoácidos e em período de 24 horas, apesar de não encontrar aminoácidos de origem bacteriana.

Apenas o estudo realizado por Vacca Smith e Bowen (2000a) e Devold e outros (2006) avaliaram o perfil proteico da película formada em presença de leite bovino e nenhum em presença de bebidas a base de soja. Esses autores encontraram proteínas de peso molecular diferente das observadas neste estudo. Vários fatores podem ter contribuído para estas diferenças como: tempo de exposição a bebida, tempo de formação da película e tipo de estudo (QUADRO 5). No estudo *in vitro*, realizado por Devold e outros (2006), a película foi previamente formada pela incubação de blocos de esmalte e saliva por 2h, seguida de uma incubação com leite pelo mesmo período. Embora, estes autores tenham utilizado a saliva total para formação da película este estudo não simula o que acontece na cavidade oral onde tanto saliva como leite são simultaneamente introduzidos. Além disso, estes autores utilizaram o mesmo volume de saliva e leite para as incubações e a concentração de proteínas na saliva é menor que a concentração de proteínas no leite. Assim, na incubação com saliva pode ser que nem toda a superfície do

esmalte tenha sido recoberta com proteínas salivares e alguns sítios foram posteriormente ocupados pelo leite. Outra possibilidade é que devido a diferença da concentração de proteínas, algumas proteínas salivares foram desadsorvidas da película durante a exposição ao leite. Já no estudo de *in situ* realizado por Vacca Smith e Bowen (2000a) a formação da película ocorreu simultaneamente a exposição ao leite ou κ -caseína, como realizado neste estudo. Entretanto as diferenças neste caso podem ser atribuídas ao tempo de formação da película. No presente estudo, as películas formadas foram coletadas após quatro horas do início de sua formação para verificar a retentividade dos componentes do leite bovino ou bebida a base de soja após maturação da película. Os resultados mostraram que uma banda de proteína de aproximadamente 42,72 kDa permaneceu adsorvida após essas 4 horas. Vacca Smith e Bowen (2000a) observaram em curto prazo que o perfil proteico das películas formadas em presença de leite apresenta várias bandas de proteína adicionais a película formada em presença de saliva. Estes resultados diferem dos observados neste estudo, provavelmente, pelo fato de que, nas etapas iniciais de adsorção, a concentração local de proteínas do leite na interfase saliva-esmalte é alta. Com o tempo, a saliva vai lavando a cavidade bucal, diminuindo a quantidade local de leite e as proteínas que adsorveram fracamente à película, são desadsorvidas. Nenhuma proteína de aproximadamente 42,72 kDa foi observada nas película formada em presença de leite bovino e κ -caseína, até 20 min após exposição a estes componentes (VACCA SMITH; BOWEN, 2000a).

Como a película *in vivo* pode conter componentes que sofrem transformações enzimáticas (LAMKIN et al., 2001; YAO et al., 2001; YAO et al., 2003) uma outra possibilidade seria que a proteína de aproximadamente 42 kDa, seria produto de proteólise. Haukioja e outros (2008) incubaram saliva da parótida com probióticos e verificaram que o desaparecimento da glicoproteína gp340 e a diminuição da atividade de peroxidase associada ao aparecimento de uma banda de massa molecular inferior identificada como peroxidase, sugerindo que esta proteína sofreu proteólise.

Além disso, a presença do leite pode mudar as interações das proteínas em solução, modificando sua estrutura ou polaridade e aumentando ou não a afinidade de uma proteína salivar em adsorver ao esmalte dental.

O estudo de Vacca Smith e Bowen (2000a) mostra claramente os efeitos do leite bovino e κ -caseína na composição da película dental adquirida, quando formada simultaneamente com a saliva. Entretanto, o estudo não identificou as proteínas presentes nos diferentes tratamentos. O maior desafio na identificação de proteínas da película dental adquirida é a obtenção de quantidade suficiente de material para análise (LI et al., 2003; LI et al., 2004) e este foi um dos desafios enfrentados também no presente estudo. Este fator foi amenizado realizando coletas em todos os dentes, nas faces vestibular e lingual, além da repetição da coleta 3 vezes em um mesmo dente. Outro fator que nos levou a realizar as coletas de todos os dentes foram as diferenças de composição segundo ao local intra-oral (AMAECCHI et al., 1999; HANNIG; BALZ, 1999; HANNIG; JOINER, 2006; DEIMLING et al., 2007).

Alguns estudos sugerem que a dieta interfere na composição da película adquirida do esmalte e que estas mudanças na película podem provocar uma mudança na formação do biofilme dental, alterando a suscetibilidade à doenças bucais (VACCA SMITH; BOWEN, 2000a; VACCA SMITH; BOWEN, 2000b; VAN DER MEI et al., 2002; FINKE et al., 2002; LI et al., 2004; TEIXEIRA et al., 2006; WERNERSON et al., 2006; TEIXEIRA et al., 2007; HAUKIOJA et al., 2008; DANIELSON et al., 2009). O QUADRO 3 representa as proteínas que compõem a PDA e suas funções em relação a adesão de microrganismos. Como pode ser observado, as proteínas exercem funções específicas e, portanto, a ausência ou presença de determinada proteína compondo a PDA pode aumentar ou diminuir a adesão de certas bactérias e até mesmo modificar a ação antibacteriana, o que indica a função da película dental adquirida na formação e controle do biofilme.

A polaridade da PDA foi analisada em um estudo *in vitro* e apresentou aumento da hidrofobicidade em presença de leite bovino e óleo de salada e diminuição em presença de açúcar. Esses efeitos sobre a película diminuíram a adesão de *S. oralis* quando em presença de leite bovino (VAN DER MEI et al., 2002).

O efeito de diferentes carboidratos foi analisado *in situ*, mostrando haver influência da sacarose, sorbitol, xilitol e tampão fosfato na composição da PDA e sugerindo influências na sucessão microbiana (VACCA SMITH; BOWN, 2000b).

O soja apresenta uma proteína lectina de 42 kDa e o Leite Bovino apresenta a Peroxidase 40kDa , sugerindo que as bandas encontrada neste trabalho, com a

massa molecular semelhante a estes compostos, possam ser lectina e peroxidase. Entretanto, para confirmar essa hipótese é necessária a realização de SDS-PAGE em 2D para a separação das proteínas formadas em diferentes condições, sendo submetidas a digestão com tripsina e identificadas por espectrometria de massa.

Apesar dos estudos analisarem a interferência da dieta na composição da película, poucos foram os que realizaram a identificação de proteínas. A identificação das proteínas pode prever se o alimento possui efeito protetor ou cariogênico e contribuir para determinar o risco de cárie e/ou doença periodontal nos indivíduos.

6 CONCLUSÕES

O leite bovino e a bebida a base de soja interferem na composição da película dental adquirida.

O efeito da ingestão de leite bovino e bebida a base soja estendem-se pelo menos até 4 horas após a ingestão destas bebidas.

A formação da película dental adquirida é específica não só na presença de saliva, mas também de leite bovino e da bebida a base de soja.

REFERÊNCIAS

AMAECCHI, B.T.; HIGHAM, S.M.; EDGAR, W.M.; MILOSEVIC, A. Thickness of Acquired Salivary Pellicle as a Determinant of the Sites of Dental Erosion. **Journal of Dental Research**, v.78, n.12, p.1821-1828, 1999.

AMBATIPUDI, K.S.; HAGEN, F.K.; DELAHUNTY, C.M.; 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. **Journal of Proteome Research**, v.9, n.12, p.6605–6614, 2010.

BENNICK, A. Interaction of plant polyphenols with salivary proteins. **Critical Reviews in Oral Biology and Medicine**, v.13, n.2, p.184–196, 2002.

BHAT S.S.; DUBEY, A. Acidogenic potential of Soya infant formula in comparison with regular infant formula and bovine milk: A plaque pH study. **Journal of Indian Society of Pedodontics and Preventive Dentistry**, v.21, n.1, p.30-34, 2006.

BOWEN, W.H.; PEARSON, S.K.; VANWUYCKHUYSE, B.C; TABAK, L.A. Influence of milk, lactose-reduce milk, and lactose on caries in desalivated rats. **Caries Research**, v.25, n.4, p.283-286, 1991.

BRADFORD, M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, n.1-2, p.248-254, 1976.

BRUVO, M.; MOE, D.; KIRKEBY, S.; VORUM, H.; BARDOW, A. Individual Variations in Protective Effects of Experimentally Formed Salivary Pellicles. **Caries Research**, v.43, n.3, p.163–170, 2009.

CABRAS, T.; PISANO, E.; BOI, R.; OLIANAS, A.; MANCONI, B.; INZITARI, R.; et al. Age-Dependent Modifications of the Human Salivary Secretory Protein Complex. **Journal of Proteome Research**, v.8, n.7, p.4126-4134, 2009.

CASTAGNOLA, M.; INZITARI, R.; FANALI, C.; IAVARONE, F.; VITALI, A.; DESIDERIO, C.; et al. The surprising composition of the salivary proteome of preterm human newborn. **Molecular Cell Proteomics**, v.10, n. 1, 2011.

DANCHAIWIJITR, A.; NAKORNCHAI, S.; THAWEEBOON, B.; et al. The effect of different milk formulas on dental plaque pH. **International Journal of Paediatric Dentistry**, v.16, n.3, p.192-8, 2006.

DANIELSSON, N.L.; HERNELL, O.; JOHANSSON, I. Human Milk Compounds Inhibiting Adhesion of Mutans Streptococci to Host Ligand-Coated Hydroxyapatite in vitro. **Caries Research**, v.43, n.3 p.171–178, 2009.

DAWES, C. Salivary flow patterns and the health of hard and soft oral tissues. **The Journal of American Dental Association**, v.139, n.5, p.18S-24S, 2008.

DEIMLING, D.; HANNIG, C.; HORT-HANNIG, W.; SCHMITZ, P.; SCHULTE-MONTIN, J.; HANNIG, M. Non-destructive visualization of protective proteins in the in situ pellicle. **Clinical Oral Investigations**, v.11, n.3, p.211-216, 2007.

DEVOLD, T.G.; RYKKE, M.; ISABEY, D.; SORENSEN, E.S.; CHRISTENSEN, B.; LANGSRUD, T.; et al. In vitro studies of adsorption of milk proteins onto tooth enamel. **International Dairy Journal**, v.16, n.9, p.1013–1017, 2006.

FINKE, M.; PARKER, D.M.; JANDT, K.D. Influence of Soft Drinks on the Thickness and Morphology of *in Situ* Acquired Pellicle Layer on Enamel. **Journal of Colloid and Interface Science**, v.251, n.2, p.263–270, 2002.

FLEISSING, Y.; REICHENBERG, E.; REDLICH, M.; ZAKS, B.; DEUTSCH, O.; AFRAMIAN, D.J.; PALMON, A. Comparative proteomic analysis of human oral fluids according to gender and age. **Oral Diseases**, v. 16, n.8, p.831-838, 2010.

GARCIA-GODOY, F.; HICKS, M.J. Maintaining the integrity of the enamel surface: The role of dental biofilm, saliva and preventive agents in enamel demineralization and remineralization. **The Journal of the American Dental Association**, v.139, n.5, p.25S-34S, 2008.

HANNIG, C.; BECKER, K.; HAUSLER, N.; HOTH-HANNIG, W.; ATTIN, T.; HANNIG, C. Protective effect of the in situ pellicle on dentin erosion-an ex vivo pilot study. **Archives of Oral Biology**, v.52, n.5, p. 444-449, 2007.

HANNIG, C.; SPITZMULLER, B.; AL-AHMAD, A.; HANNIG, M. Effect of Cistus-tea on bacterial colonization and enzyme activities of the in situ pellicle. **Journal of Dentistry**, v.36, n.7, p.540-545, 2008.

HANNIG, C.; BERNDT, D.; HOTH-HANNIG, W.; HANNIG, M. The effect of acidic beverages on the ultra structure of the acquired pellicle—An in situ study. **Archives of Oral Biology**, v.54, n.6, p. 518-526, 2009.

HANNIG, M.; BALZ, M. influence of in vivo formed salivary pellicle on enamel erosion. **Caries Research**, v.33, n.5, p.372-379, 1999.

HANNIG, M.; HESS, N.J.; HORTH-HANNIG, W.; VRESE, M. Influence of salivary pellicle formation time on enamel demineralization – an in situ pilot study. **Clinical Oral Investigations**, v.7, n.3, p.158-161, 2003.

HANNIG, M.; FIEBIGER, M.; GUNTZER, M.; DOBERT, A.; ZIMEHL, R.; NEKRASHEVYC, Y. Protective effect of the in situ formed short-term salivary pellicle. **Archives of Oral Biology**, v.49, n.11, p.903-910, 2004.

HANNIG, M.; JOINER, A. The structure, function and properties of the acquired pellicle. **Monographs in Oral Science**, v.19, p.29-64, 2006.

HARA, A.T.; ANDO, M.; GONZÁLEZ-CABEZAS, C.; CURY, J.A.; SERRA, M.C.; ZERO, D.T. Protective Effect of the Dental Pellicle against Erosive Challenges in situ. **Journal of Dental Research**, v.85, n.7, p.612-616, 2006.

HARA, A.T.; ZERO, D.T. The Caries Environment: Saliva, Pellicle, Diet, and Hard Tissue Ultrastructure. **Dental Clinics of North America**, v.54, n.3, p.455-467, 2010.

HAUKIOJA, A.; LOIMARANTA, V.; TENOVUO, J. Probiotic bacteria affect the composition of salivary pellicle and streptococcal adhesion in vitro. **Oral Microbiology and Immunology**, v.23, n.4, p.336–343, 2008.

HELLHAMMER, D.H.; WUST, S.; KUDIELKA, B.M. Salivary cortisol as a biomarker in stress research. **Psychoneuroendocrinology**, v.34, n.2, p.163-171, 2009.

HELMERHORST, E.J.; OPPENHEIM, F.G. Saliva: a Dynamic Proteome. **Journal of Dental Research**, v.86, n.8, p.680-693, 2007.

JENSEN, J.L.; LAMKIN, M.S.; OPPENHEIM, F.G. Adsorption of Human Salivary Proteins to Hydroxyapatite: A comparison between whole saliva and glandular salivary secretions. **Journal of Dental Research**, v.71, n.9, p.1569-1576, 1992.

JOINER, A.; MULLER, D.; ELOFSSON, U.M.; MALMSTEN, M.; ARNEBRANT, T. Adsorption from black tea and red wine onto in vitro salivary pellicles studied by ellipsometry. **European Journal of Oral Science**, v.111, n.5, p.417-422, 2003.

JOINER, A.; MULLER, D.; ELOFSSON, U.M.; ARNEBRANT, T. Ellipsometry analysis of tea polyphenols onto salivary pellicles. **European Journal of Oral Science**, v.112, n.6, p.510-515, 2004.

JOINER, A.; ELOFSSON, U.M.; ARNEBRANT, T. Adsorption of chlorhexidine and black tea onto in vitro salivary pellicles, as studied by ellipsometry. **European Journal of Oral Science**, v.114, n.5, p.337-342, 2006.

KAUFMAN, E.; LAMSTER, I.B. The diagnostic applications of saliva - a review. **Crit rev oral Biol Med**, v.13, n.2, p.197-212, 2002.

KHAN, N.; MUKHTAR, H. Tea polyphenols for health promotion. **Life Sciences**, v.81, n.7, p.519-533, 2007.

KOLENBRANDER, P.E.; PALMER, R.J.; RICKARD, A.H.; JAKUBOVICS, N.S.; CHALMERS, N.I.; DIAZ, P.I.. Bacterial interactions and successions during plaque development. **Periodontology 2000**, v.42, n.1, p.47-79, 2006.

LAMKIN, M.S.; ARANCILLO, A.A.; OPPENHEIM, F.G. Temporal and Compositional Characteristics of Salivary Protein Adsorption to Hydroxyapatite. **Journal of Dental Research**, v.75, n.2, p.803-808, 1996.

LENDENMANN, U.; GROGAN, J.; OPPENHEIM, F.G. Saliva and dental pellicle- A review. **Advances in Dental Research**, v.14, n.1, p.22-28, 2000.

LI, J.; HELMERHORST, E.J.; CORLEY, R.B.; LUUS, L.E.; TROXLER, R.F.; OPPENHEIM, F.G. Characterization of the immunologic responses to human *in vivo* acquired enamel pellicle as a novel means to investigate its composition. **Oral Microbiol Immunol**, v.18, n.3, p.183-191, 2003.

LI, J.; HELMERHORST, E.J.; TROXLER, R.F.; OPPENHEIM, F.G. Identification of *in vivo* Pellicle Constituents by Analysis of Serum Immune Responses. **Journal of Dental Research**, v.83, n.1, p.60-64, 2004.

LUCZAJ, W.; SKRZYDLEWSKA, E. Antioxidative properties of black tea. **Preventive Medicine**, v.40, n.6, p.910-918, 2005.

MERCÊS, M.; FARIAS, A.G.; BERNARDI, M.; NETO, R.S.; TAMES, D.R.; SILVEIRA, E.G.; BOTTAN, E.R. Evaluation of Erosive Properties of Industrialized Beverages Containing Soy. **Pesquisa Brasileira de Odontopediatria Clinica Integrada**, v. 9, n.3, p.277-281, 2009.

MILLER, C.S.; KING JR., C.P.; LANGUB, M.C.; KRYSCIO, R.J.; THOMAS, M.V. Salivary biomarkers of existing periodontal disease: A cross-sectional study. **The Journal of the American Dental Association**, v.137, n.3, p.322-329, 2006.

NEKRASHEVYCH, Y.; STOSSER, L. Protective Influence of Experimentally Formed Salivary Pellicle on Enamel Erosion. **Caries Research**, v.37, n.3, p.225-231, 2003.

NEKRASHEVYCH, Y.; HANNIG, M.; STOSSER, L. Assessment of Enamel Erosion and Protective Effect of Salivary Pellicle by Surface Roughness Analysis and Scanning Electron Microscopy. **Oral Health and Preventive Dentistry**, v.2, n.1, p.5-11, 2004.

NEESER, J.R.; GOLLIARD, M.; WOLTZ, A.; ROUVET, M.; DILLMANN, M.L.; GUGGENHEIM, B. In vitro modulation of oral bacterial adhesion to saliva-coated hydroxyapatite beads by milk casein derivatives. **Oral Microbiology Immunology**, v.9, n.4, p.193-201, 1994.

NIEW AMERONGEN, A.V.; BOLSCHER, J.G.M.; VEERMAN, E.C.I. Salivary protein: protective and diagnostic value in cariology? **Caries Research**, v. 38, n. 3, p. 247-253, 2004.

PAPA, A.M.C.M.; TENUTA, L.M.A.; TABCHOURY, C.P.M.; CURY, A.A.D.B.; ARTHUR, R.A.; CURY, J.A. Effect of Milk and Soy-based infant Formulas on In Situ Demineralization of Human Primary Enamel. **Pediatric Dentistry**, v 32, n.1, p.35-40, 2010.

PROCTOR, G.B.; PRAMANIK, R.; CARPENTER, G.H.; REES, G.D. Salivary Proteins Interact with Dietary Constituents to Modulate Tooth Staining. **Journal of Dental Research**, v.84, n.1, p.73-78, 2005.

RAI, B.; KHARB, S.; JAIN R.; ANAND, S.C. Biomarkers of Periodontitis in oral fluids. **Journal of Oral Science**, v.50, n.1, p.53-56, 2008.

RAMOS, M.V.; GRANGEIRO, T.B.; CAVADA, B.S.; SHEPHERD, I.; LOPES, R.O.M.; SAMPAIO, A.H. Carbohydrate/glycan-binding specificity of legume lectins in respect

to their proposed biological functions. **Brazilian Archives Biology and Technology**, v.43, n.4, p.0-0, 2000.

ROSAN, B.; LAMONT, R. Dental plaque formation. **Microbes and Infection**, v.2, n.13, p.1599–1607, 2000.

RUDNEY, J.D.; STAIKOV, R.K.; JOHNSON, J.D. Potential biomarkers of human salivary function: A modified proteomic approach. **Archives of Oral Biology**, v.54, n.1, p. 91-100, 2009.

RYKKE, M.; SONJU, T. Amino acid composition of acquired enamel pellicle collect in vivo after 2 hours and after 24 hours. **Scand J Dent Res**. v.99, p.463-469, 1991.

SCARANO, E.; FIORITA, A.; PICCIOTTI, P.M.; PASSALI, G.C.; CALO, L.; CABRAS, T.; et al. Proteomics of saliva: personal experience. **Acta Otorhinolaryngologica Italica**, v.30, n.3, p.125-130, 2010.

SCHENKELS, L.C.P.M.; VEERMAN, E.C.I.; NIEW AMERONGEN, A.V. Biochemical composition of human saliva in relation to other mucosal fluids. **Critical Reviews in Oral Biology and Medicine**, v. 6, n.2, p. 161-175, 1995.

SCHUPBACH, P.; OPPENHEIM, F.G.; LENDENMANN, U.; LAMKIN, M.S.; YAO, Y.; GUGGENHEIM, B. Electron-microscopic demonstration of proline-rich proteins, statherin, and histatins in acquired enamel pellicle *in vitro*. **European Journal of Oral Science**, v.109, n.1, p.60-68, 2001.

SHIMADA, T. Salivary Proteins as a Defense Against Dietary Tannins. **Journal of Chemical Ecology**, v.32, n.6, p.1149–1163, 2006.

SIQUEIRA, W.L.; ZHANG, W.; HELMERHORST, E.J.; GYGI, S.P.; OPPENHEIM, F.G. Identification of Protein Components in in vivo Human Acquired Enamel Pellicle Using LC-ESI-MS/MS. **Journal of Proteome Research**, v.6, n.6, p.2152-2160, 2007.

SIQUEIRA, W.L.; OPPENHEIM, F.G. Small molecular weight proteins/peptides present in the in vivo formed human acquired enamel pellicle. **Archives of Oral Biology**, v.54, n.5, p.437-444, 2009.

TEIXEIRA, E.H.; NAPIMOGA, M.H.; CARNEIRO, V.A.; DE OLIVEIRA, T.M.; NASCIMENTO, K.S.; NAGANO, C.S.; et al. In vitro inhibition of Streptococci binding

to enamel acquired pellicle by plant lectins. **Journal of Applied Microbiology**, v.101, n.1, p.111–116, 2006.

TEIXEIRA, E.H.; NAPIMOGA, M.H.; CARNEIRO, V.A.; DE OLIVEIRA, T.M.; CUNHA, R.M.S.; A. HAVT; et al. In vitro inhibition of oral streptococci binding to the acquired pellicle by algal lectins. **Journal of Applied Microbiology**, v.103, n.4, p.1001–1006, 2007.

TEN CATE, J. M. Biofilms, a new approach to the microbiology of dental plaque. **Odontology**, v. 94, n.1, p.1-9, 2006.

VACCA SMITH, A.M.; VAN WUYCKHUYSE, B.C.; TABAK, L.A.; BOWEN, W.H. The effect of milk and casein proteins on the adherence of *Streptococcus mutans* to saliva-coated hydroxyapatite. **Archives of Oral Biology**, v.39, n.12, p.1063-1069, 1994.

VACCA SMITH, A.M.; BOWEN, W.H. The effect of Milk and kappa casein on streptococcal glucosyltransferase. **Caries Research**, v.29, n.6, p.498-506, 1995.

VACCA SMITH, A.M.; BOWEN, W.H. Binding Properties of streptococcal Glucosyltransferase for hydroxyapatite, saliva-coated hydroxyapatite and bacterial surfaces. **Archives of Oral Biology**, v.43, n.2, p.103-110, 1998.

VACCA SMITH, A.M.; BOWEN, W.H. The effect of milk and kappa-casein on salivary pellicle formed on hydroxyapatite discs *in situ*. **Caries Research**, v.34, n.1, p.88-93, 2000a.

VACCA SMITH, A.M.; BOWEN, W.H. In situ studies of pellicle formation on hydroxyapatite discs. **Archives of Oral Biology**, v.45, n.4, p.277-291, 2000b.

VAN DER MEI, H.C.; WHITE, D.J.; KAMMINGA-RASKER, H.J.; KNIGHT, J.; BAIG, A.A.; SMITH, J.; BUSCHR, H.J. Influence of dietary components in saliva and dentifrices on the wettability of pellicle-coated enamel in vitro e in vivo. **European Journal of Oral Science**, v.110, n.6, p.434-438, 2002.

VITORINO, R.; LOBO, M.J.C.; DUARTE, J.A.; FERRER-CORREIA, A.J.; TOMER, K.B.; DUBIN, J.R.; DOMINGUES, P.M.; AMADO, F.M.L. In vitro hydroxyapatite adsorbed salivary protein. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 320, n.2, p. 324-346, 2004.

VITORINO, R.; LOBO, M.J.C.; WILLIAMS, J.; FERRER-CORREIA, A.J.; TOMER, K.B.; DUARTE, J.A.; et al. Peptidomic analysis of human acquired enamel pellicle. **Biomedical Chromatography**, v.21, n.11, p.1107–1117, 2007.

WARNER, E.A.; KANEKANIAN, A.D.; ANDREWS, A.T. Bioactivity of Milk proteins: Anticariogenicity of whey proteins. **International Journal of Dairy Technology**, v.54, n.4, p.151-153, 2001.

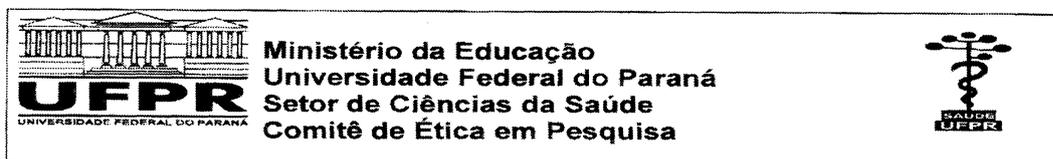
WERNERSSON, J.; DANIELSSON NIEMI, J.; EINARSON, S.; HERNELL, O.; JOHANSSON, I. Effects of Human Milk on Adhesion of *Streptococcus mutans* to Saliva-Coated Hydroxyapatite in vitro. **Caries Research**, v.40, n.5, p.412–417, 2006.

YAO, Y.; GROGAN, J.; ZEHNDER, M.; LENDENMANN, U.; NAM, B.; WU, Z.; et al. Compositional analysis of human acquired enamel pellicle by mass spectrometry. **Archives of Oral Biology**, v.46, n.4, p. 293–303, 2001.

YAO, Y.; BERG, E.A.; COSTELLO, C.E.; TROXLER, R.F.; OPPENHEIM, F.G. Identification of Protein Components in Human Acquired Enamel Pellicle and Whole Saliva Using Novel Proteomics Approaches. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n.7, p.5300–5308, 2003.

ANEXO

Termo de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR



Curitiba, 27 de agosto de 2009.

Ilmo (a) Sr. (a)
Wanessa Bueno Otto

Nesta

Prezado(a) Pesquisador(a),

Comunicamos que a emenda solicitada no dia 12 de agosto de 2009 do projeto intitulado "**Estudo *in vivo* da interferência de bebidas de soja na formação da película adquirida**" foi aprovado em reunião realizada no dia 26 de agosto de 2009 e está de acordo com as normas éticas estabelecidas pela Resolução CNS 196/96.

Registro CEP/SD: 644.181.08.11

CAAE: 0070.0.091.000-08

Conforme a Resolução CNS 196/96, solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos.

Atenciosamente


Prof. Dr.ª Liliansa Maria Labronici
Coordenadora do Comitê de Ética em
Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde

Prof.ª Dr.ª Liliansa Maria Labronici
Coordenadora do Comitê de Ética em
Pesquisa - SD/UFPR