

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

MARIA TERESA VALENTE

**Peptídeos peptidomiméticos da película adquirida do esmalte:
efeitos no crescimento de cristal de hidroxiapatita**

BAURU
2017

MARIA TERESA VALENTE

**Peptídeos peptidomiméticos da película adquirida do esmalte:
efeitos no crescimento de cristal de hidroxiapatita**

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

Orientador: Prof^a. Dra. Maria Aparecida de Andrade
Moreira Machado

Coorientador: Prof. Dr. Walter Luiz Siqueira

Versão Corrigida

BAURU
2017

V234p Valente, Maria Teresa
Peptídeos peptidomiméticos da película
adquirida do esmalte: efeitos no crescimento de
cristal de hidroxiapatita / Maria Teresa Valente –
Bauru, 2017.
84p. : il. ; 31cm.

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

Orientadora: Prof^a. Dra. Maria Aparecida de
Andrade Moreira Machado

Coorientador: Prof. Dr. Walter Luiz Siqueira

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

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

Assinatura:

Data:

FOLHA DE APROVAÇÃO

DEDICATÓRIA

Aos meus queridos filhos

Rodrigo, Mariana e Renato

Pelo apoio, carinho e amor por mim

Vocês me incentivam e me ajudam a viver melhor

Obrigada por me ajudarem a realizar mais uma etapa de importância em minha vida

Amo vocês

*Ao **Daniel**, meu genro, mais um filho no meu coração*

*Ao meu amado neto **Arthur**, sua chegada nos engrandeceu e encantou nossa existência*

*À minha mãe **Cyrene***

Querida, grande exemplo para todos nós

Obrigada pelos ensinamentos e vivência

*Ao meu pai **Valente** (in memoriam)*

Seu apoio e confiança em mim

Fizeram-no o meu primeiro e grande mestre

E o maior responsável por esta trajetória tão corajosa

Grande exemplo de vida e caráter

Te amo e te admiro

Sempre estará em nossos corações

*Aos meus irmãos **Antonio, Vera, Carlos***

Por estarem sempre ao meu lado e unidos

*E ao **Paulo**, meu irmão e colega*

Que muito colaborou para o sucesso desta minha caminhada

Tornou minha estada no Canadá possível

Com responsabilidade, presença e amor

Obrigada pelo carinho e dedicação

*À toda **minha família** pela proteção*

Grandeza e dignidade

Além do constante apoio, ajuda e compreensão

*Aos meus queridos **Giuliana, Pedro e Nel***

Por me ajudarem, apoiarem e colaborarem para o meu desempenho nesta caminhada

*À minha querida e amada **Vó Lene (in memoriam)***

Por todo amor, carinho e dedicação sempre dispensados a mim

*À minha querida **tia Daguinha (in memoriam)***

Pelo acolhimento, alegria e desprendimento

*Ao **Eduardo Moffa**, meu carinho e reconhecimento por toda colaboração e espírito de doação. Recebeu-me no Canadá, como meu irmão. Recepcionou-me e facilitou minha interação num país tão diferente do nosso. Transmitiu-me seus conhecimentos e experiências sendo um verdadeiro colega. Grande mestre. Minha eterna gratidão, amizade e admiração*

AGRADECIMENTO ESPECIAL

*À minha orientadora, Prof^a. Dra. **Maria Aparecida de Andrade Moreira Machado**, pela oportunidade e confiança depositada em mim*

Pela competência, capacidade profissional, dinamismo, força de trabalho, entusiasmo, pelo companheirismo, conhecimentos transmitidos, extrema dedicação e valorização à Universidade de São Paulo

Muito obrigada também pelos momentos de descontração e todo incentivo e apoio oferecidos a mim

Minha eterna admiração e gratidão

*Ao meu coorientador, Prof. Dr. **Walter Luiz Siqueira**, por me receber de braços abertos em seu laboratório, com significativo apoio para a eficácia do meu desempenho nas pesquisas*

Sua colaboração foi vital para o meu crescimento pessoal e profissional

Um professor exemplar, muito respeitado e valorizado na Western University - Canada, com capacidade profissional louvável

Agradeço imensamente pela oportunidade, amizade, ajuda, orientação e respeito concedidos

AGRADECIMENTOS

Aos meus colegas e amigos do laboratório da Western University - Canada minha eterna gratidão

***Flávia**, amiga e colaboradora, soube dividir grande parte dos seus conhecimentos e tornou-se uma companhia alegre e fraternal. Obrigada por todos os momentos de descontração e de muito trabalho*

***David**, meu colega exemplar, obrigada pela amizade, dedicação e companheirismo. A transmissão de seus conhecimentos enriqueceu-me nesta jornada*

***Tayebeh**, minha companheira e profissional maravilhosa. A possibilidade de conhecer a sua cultura e os seus ensinamentos iranianos foi fascinante. Agradecida pelo carinho, atenção, profissionalismo e amizade*

***Karla**, colega de trabalho, obrigada pela ajuda, pelos bons momentos vividos no laboratório, por sua companhia e de sua família em passeios inesquecíveis*

Cindy, obrigada pela colaboração e paciência. Sua ajuda foi de muita valia

Heidi, minha professora, amiga e conselheira, obrigada pelos ensinamentos. Sua ajuda foi fundamental para o desenvolvimento do meu trabalho. Serei sempre grata

Rajesh, obrigada pelo respeito e convivência

Às minhas professoras **Ana Luísa**, amiga e competente mestre, agradeço a confiança, incentivo e dedicação nos meus estudos; **Valerie, Eliton e Ana Maria**, cujos ensinamentos colaboraram para a concretização deste trabalho

Aos meus **amigos**

Em especial à Ciça, Lilian, Odinez, S.Vitório, Cristina, Joana, Néia, Marlene, Fátima, Vera, Yone, Celinha e Mariana

Pela participação carinhosa e dedicada em minha vida

À Faculdade de Odontologia de Bauru

Universidade de São Paulo

*Diretora Prof^a. Dra. **Maria Aparecida de Andrade Moreira Machado e***

*Vice-Diretor Prof. Dr. **Carlos Ferreira dos Santos***

Ao Presidente da Comissão de Pós-Graduação – FOB - USP

*Prof. Dr. **Guilherme Janson***

Pelo empenho e dedicação ao nosso Departamento

*Aos **Professores do Curso de Pós-Graduação***

Pelos conhecimentos e ensinamentos prestados

*Aos **docentes e funcionários** do Departamento de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Bauru - FOB-USP, pela colaboração no desenvolvimento deste trabalho*

*Aos **Funcionários da Pós-Graduação**, pela prontidão e eficiência*

*Aos **Funcionários da Biblioteca**, pela ajuda prestada em prol deste trabalho, em especial ao **José Roberto***

*Aos meus queridos **colegas de doutorado***

*Aos meus estimados **amigos** do Canadá*

*Em especial à **Júlia, Steve, Lúcia, Carlito, Paula, Brisa, Michelle, Joe, Thomas, Maria João, José, Maria, Renato, Maura, Giovanna, Patrícia, Beatriz, Lili, Maria, Joey, Ted, Wellington, Isadora, Teresa, Ruben***

Por me sentir numa grande família nesse país, amigos para sempre

**“Tudo posso
Naquele que me
fortalece”**

Fil 4:13

*Agradeço a **Deus**
Pela permanente presença
Em minha vida*

RESUMO

Os peptídeos da estaterina (DR9) e da histatina 3 (RR14), que ocorrem naturalmente na película *in vivo*, amplificam o efeito inibitório do crescimento de cristais de hidroxiapatita, função relacionada à remineralização do esmalte e formação de cálculos dentários. A hipótese da duplicação/hibridação de domínios funcionais dos peptídeos DR9 da estaterina e RR14 da histatina 3 foi testada. Para isto, os peptídeos peptidomiméticos (DR9-DR9, DR9-RR14), além deles individualmente e suas proteínas intactas (DR9, RR14, estaterina e histatina 3) foram estudados em sete concentrações diferentes para avaliar o efeito da inibição do crescimento de cristais de hidroxiapatita. Foi utilizado um ensaio colorimétrico de microplaca para quantificar o crescimento de cristais de hidroxiapatita. As experiências foram feitas em triplicata e a concentração inibitória (IC₅₀) foi estabelecida para cada grupo. A IC₅₀ foi calculada para todos os peptídeos e proteínas testados. A histatina 3 e o RR14 não atingiram o valor de IC₅₀. O DR9-RR14 atingiu o valor de IC₅₀ a 3,80 µM. Como esperado, DR9 e DR9-DR9 demonstraram um efeito inibitório significativo na atividade de crescimento de cristais, atingindo o valor de IC₅₀ a 2,82 µM e 1,07 µM, respectivamente. A estaterina atingiu o valor de IC₅₀ a 2,50 µM. Na análise estatística, foram aplicados os testes ANOVA e Student-Newman-Keuls para comparações por pares, para comparar os valores entre os grupos. O DR9-DR9 amplificou o efeito inibitório do crescimento de cristais de hidroxiapatita quando comparado com DR9 único (p <0,05), demonstrando que a multiplicação do domínio funcional é uma forte tendência evolutiva da proteína. De forma interessante, o peptídeo híbrido DR9-RR14 demonstrou um efeito inibitório intermediário quando comparado com outros dois grupos: DR9 único e DR9-DR9. Este estudo utilizou a abordagem peptidomimética para investigar uma via potencial de evolução da proteína relacionada com a duplicação/hibridação dos constituintes peptídicos naturais da película adquirida de esmalte. O conhecimento obtido por meio dos resultados deste trabalho pode fornecer uma base para o desenvolvimento de peptídeos sintéticos para uso terapêutico, tanto contra cárie dentária, como para a doença periodontal.

Palavras-chave: Película de esmalte, Proteínas salivares, Peptídeos, Inibição do crescimento de cristais, Saliva.

ABSTRACT

Peptidomimetics of acquired enamel pellicle peptides: effects on hydroxyapatite crystal growth

The statherin and histatin 3 peptides (DR9 and RR14 respectively), which occur naturally in the film in vivo, amplify the inhibitory effect for the growth of hydroxyapatite crystals, a function related to remineralization of the enamel and formation of dental calculi. The hypothesis of duplication/hybridization of functional domains of the DR9 peptides of the statherin and RR14 of histatin 3 was tested. For this, the peptidomimetic peptides (DR9-DR9, DR9-RR14), in addition to them individually and their intact proteins (DR9, RR14, statherin and histatin 3) were studied at seven different concentrations to evaluate the effect of growth inhibition of hydroxyapatite crystals. A colorimetric assay of microplate was used to quantify the growth of hydroxyapatite crystals. The experiments were done in triplicate and the inhibitory concentration (IC_{50}) was established for each group. The IC_{50} was calculated for all peptides and proteins tested. Histatin 3 and RR14 did not reach the IC_{50} value. DR9-RR14 reached the IC_{50} value at 3.80 μ M. As expected, DR9 and DR9-DR9 demonstrated a significant inhibitory effect on crystal growth activity, reaching the IC_{50} value at 2.82 μ M and 1.07 μ M, respectively. Statherin reached the IC_{50} value at 2.50 μ M. ANOVA and Student-Newman-Keuls tests for paired comparisons were applied to compare the values between the groups. DR9-DR9 amplified the inhibitory effect of hydroxyapatite crystal growth when compared to single DR9 ($p < 0.05$), demonstrating that the multiplication of the functional domain is a strong protein evolution pathway. Interestingly, the hybrid peptide DR9-RR14 demonstrated an intermediate inhibitory effect when compared to other two groups: single DR9 and DR9-DR9. This study utilized the peptidomimetic approach to investigate a potential pathway of protein evolution related to duplication/hybridization of the natural peptidic constituents of the acquired enamel film. The knowledge obtained through the results of this work can provide a basis for the development of synthetic peptides for therapeutic use, both against dental caries and for periodontal disease.

Key words: Enamel pellicle, Salivary proteins, Peptides, Crystal growth inhibition, Saliva.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURAS

- Figura 1 - Gráfico do efeito de inibição de peptídeos construídos derivados de estaterina e histatina 3 sobre o crescimento de cristais de hidroxiapatita. *Nota.* As barras representam o desvio padrão da média, calculada a partir de 3 experimentos independentes.67
- Figura 2 - Gráfico do efeito de inibição dos peptídeos DR9-RR14, DR9 e RR14 quando comparado com uma solução de mistura contendo DR9 e RR14 (DR9 + RR14). *Nota.* As barras representam o desvio padrão da média, calculada a partir de 3 experimentos independentes.....68
-
-

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Peptídeos peptidomiméticos derivados de estaterina e histatina 3....59
- Tabela 2** - Peptídeos construídos derivados de estaterina e histatina 3 e seus pI calculados. *Nota.* Sp é uma serina fosforilada.65
- Tabela 3** - Efeito de peptídeos construídos derivados de estaterina e histatina 3 em diferentes concentrações sobre inibição de crescimento de cristais de hidroxiapatita (HA).66
- Tabela 4** - O valor IC₅₀ de DR9, DR9-DR9, DR9-RR14 e estaterina. *Nota.* RR14 e histatina 3 não atingiram um IC₅₀ , com base nas 7 concentrações testadas.67
-
-

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

AEBSF	AminoethylBenzeneSulfonyl Fluoride hydrochloride/ Cloridrato de fluoreto de amino-metil-sulfonil
AEP	Acquired Enamel Pellicle/ Película Adquirida do Esmalte
AMP	Antimicrobial Peptide and Protein/ Proteína e Peptídeo Antimicrobiano
ANOVA	Analysis of Variance/ Análise de Variância
CaCl ₂	Calcium chloride/ Cloreto de Cálcio
CD	Circular Dichroism/ Dicroísmo Circular
cDNA	Complementary Deoxyribonucleic Acid/ DNA complementar
CLSM	Confocal Laser Scanning Microscopy/ Microscopia Confocal de Varredura a Laser
COD	Calcium Oxalate Dihydrate/ Oxalato de Cálcio Di-Hidratado
COM	Calcium Oxalate Monohydrate/ Oxalato de Cálcio Monohidratado
DCPD	Dicalcium Phosphate Dihydrate/ Di-Hidrato de Fosfato Dicálcico
DR9	Statherin peptide / Peptídeo de estaterina
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic Acid/ Ácido etilenodiamino tetra-acético
ESI	Electrospray Ionization/ Ionização por “Electrospray”
GST	Glutathione S-Transferase/ Glutathiona S-Transferase
H5	Histatin 5/ Histatina 5
HA	Hydroxyapatite/ Hidroxiapatita
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid/ Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinoetanossulfônico
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography/ Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
IC ₅₀	Inhibitory Concentration/ Concentração Inibitória
IEF	Isoelectric Focusing / Focalização Isoelétrica
IR	Infrared spectra/ Espectroscopia no Infravermelho
kDa	Kilodaltons/ Quilodaltons
KH ₂ PO ₄	Potassium Dihydrogen Phosphate/ Dióxido de Hidrogênio Fosfato de Potássio
MALDI	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization/ Ionização e Dessorção a Laser Assistida por Matriz

MD	Molecular Dynamics/ Dinâmica Molecular
mL	Millilitre/ Mililitro
MS	Mass Spectrometry/ Espectrometria de Massa
MS/MS	Tandem Mass Spectrometry/ Espectrometria de Massa em tandem
MW	Molecular Weight/ Peso Molecular
Na ₂ HPO ₄	Sodium Hydrogen Phosphate/ Hidrogenofosfato de Sódio
NaCl	Sodium Chloride/ Cloreto de sódio
NMR	Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy/ Espectroscopia por Ressonância Magnética Nuclear
OCP	Octacalcium Phosphate/ Fosfato Octacálcico
OPN	Phosphoprotein Osteopontin/ Fosfoproteína Osteopontina
PAGE	Polyacrylamide Gel Electrophoresis/ Eletroforese em Gel de Poliacrilamida
PCR	Polymerase Chain Reaction/ Reação em Cadeia da Polimerase
pI	Isoelectric Point/ Ponto Isoelétrico
pK	Acid dissociation constant of a solution/ Constante de dissociação ácida
PMMA	Polymethylmethacrylate/ Polimetilmetacrilato
PONDR	Predictor of Natural Disordered Regions/ Preditor de Regiões Naturalmente Desordenadas
poli-asp	poly-L-aspartic acid/ ácido poli-L-aspártico
PRP	Proline-Rich Protein/ Proteína Rica em Prolina
PTF1	Prothrombin Fragment 1/ Fragmento de Protrombina 1
PTM	Post-Translational Modifications/ Modificações Pós-Translacionais
RGD	Tripeptide Arg-Gly-Asp/ Tripeptídeo Arg-Gly-Asp
RP-HPLC	Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography/ Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa
RR14	Histatin 3 peptide/ Peptídeo de histatina 3
RT	Room Temperature/ Temperatura Ambiente
SCIM	Scanning Confocal Interference Microscopy/ Microscopia de Interferência Confocal de Varredura
SEM	Scanning Electron Microscopy/ Microscopia Eletrônica de Varredura
SNK	Student-Newman-Keuls - Multiple Comparison Test/ Teste de Comparações Múltiplas

TEM	Transmission Electron Microscopy/ Microscopia Eletrônica de Transmissão
TOF	Time-Of-Flight Mass Spectrometer/ Espectrometria de Massa por Tempo De Vôo
WS	Whole Saliva/ Saliva Total
µg	Microgram/ Micrograma
µL	Microliter/ Microlitro
µM	Micromol/ Micromolar

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	21
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	27
2.1	Saliva	27
2.2	Proteínas Salivares	30
2.3	Película Adquirida do Esmalte (AEP).....	38
2.4	Cristais de Hidroxiapatita	40
2.5	Proteoma Salivar	49
3	PROPOSIÇÃO.....	55
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	59
4.1	Caracterização de peptídeos peptidomiméticos	59
4.2	Cálculo de Pontos Isoelétricos de Peptídeos.....	59
4.3	Ensaio de inibição da HA em Placa de Microtitulação	60
4.4	Análise estatística	61
5	RESULTADOS	65
6	DISCUSSÃO.....	71
7	CONCLUSÕES.....	77
	REFERÊNCIAS	81

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A saliva é formada pela secreção das glândulas salivares, fluido crevicular gengival, detritos alimentares e substâncias produzidas pelos micro-organismos bucais (EDGAR, 1992). As principais funções salivares compreendem a lubrificação e a proteção dos tecidos bucais, o tamponamento, a depuração bucal e a defesa antimicrobiana (EDGAR, 1992; DAWES, 2015). Além disso, a saliva consiste num fluido com uma mistura complexa de constituintes orgânicos e inorgânicos (DAWES, 2003). Os compostos orgânicos são predominantemente proteínas salivares e peptídeos, (OPPENHEIM et al., 2007) e os principais componentes inorgânicos da saliva são os íons de cálcio e fosfato, os quais estão relacionados a processos de remineralização do esmalte dentário, sendo de muita importância para evitar a cárie dentária ou a erosão dentária (DAWES, 2015; DAWES, 1972). A concentração destes íons inorgânicos na saliva humana indica um estado de supersaturação em relação ao cristal de hidroxiapatita (HA), principal componente do esmalte dentário (NANCOLLAS; MOHAN, 1970; MARGOLIS; MORENO, 1985). O ambiente supersaturado na saliva atua como uma força motriz para a mineralização secundária (remineralização) da superfície do esmalte. Entretanto, este processo está estritamente regulado pelas proteínas salivares, em especial, aquelas que constituem a película adquirida de esmalte (AEP), uma camada fina de proteína formada pela adsorção seletiva de proteínas e peptídeos na superfície do esmalte que protegem o dente contra a desmineralização do esmalte (MORENO; ZAHRADNIK, 1979; HANNIG et al., 2003) . Esta película proteica também impede a deposição de cálcio e fosfato na superfície do esmalte e, conseqüentemente, promove a inibição da formação do cálculo dentário (SIQUEIRA; CUSTODIO; MCDONALD, 2012). Vários estudos indicam que proteínas salivares específicas, tais como a estaterina e a histatina têm uma forte afinidade para se ligarem à HA e são capazes de evitar a precipitação de cálcio e fosfato na superfície dos dentes, inibindo a biomineralização indesejada (OPPENHEIM et al., 2007)

A AEP *in vivo* diz respeito a uma estrutura biológica complexa contendo uma proporção significativa de peptídeos naturais originados da saliva (SIQUEIRA; OPPENHEIM, 2009). De um ponto de vista funcional, os peptídeos de identificação

na AEP representam um grande interesse porque muitas proteínas salivares exibem domínios funcionais que mantêm a atividade da proteína nativa. Por exemplo, a partir de cinco peptídeos da AEP de ocorrência natural, derivados da estaterina, o DR9, que consiste em 9 aminoácidos DSpSpEEKFLR (em que Sp é uma serina fosforilada), mostrou um efeito significativo na inibição do crescimento de hidroxiapatita em todas as concentrações estudadas, quando comparado com outros peptídeos da estaterina nativa da AEP (Xiao et al., 2015). Outro peptídeo que ocorre naturalmente, encontrado na AEP *in vivo*, derivado da histatina 3, corresponde ao RR14; um único domínio funcional representado por 14 resíduos de aminoácidos localizados na região média da histatina 3, uma proteína antifúngica crítica (SIQUEIRA; OPPENHEIM, 2009; ZIMMERMAN et al., 2013).

As proteínas salivares contêm uma ou mais repetições de domínios funcionais dentro de sua estrutura primária, melhorando assim, sua capacidade funcional sob desafios evolutivos (OPPENHEIM et al., 2012). Neste cenário, a estaterina e histatina 3 são proteínas evolutivamente jovens, uma vez que seus domínios funcionais, DR9 e RR14, respectivamente, não são repetidos na sua estrutura primária. A duplicação artificial desta sequência peptídica (DR9) pode induzir os efeitos que esperamos ver ao longo da evolução, criando uma proteína salivar com homeostase dentária melhorada, como a alta inibição dos cristais de fosfato de cálcio na saliva, função essencial para promover a remineralização e inibição do cálculo dentário.

Além da replicação de um domínio funcional, outros processos evolutivos da proteína ocorrem em domínios funcionais de fusão de proteínas diferentes para um efeito combinatório. Enquanto as repetições de domínio funcional são projetadas para aumentar uma única característica funcional, a combinação de duas entidades funcionais distintas pode levar a construções com múltiplas funções. A abordagem híbrida é particularmente promissora para os componentes da película, uma vez que alguns peptídeos da AEP mostram uma elevada afinidade com a HA, enquanto que outros peptídeos têm funções diferentes, tais como propriedades antimicrobianas (VUKOSAVLJEVIC; CUSTODIO; SIQUEIRA, 2011; VUKOSAVLJEVIC et al., 2012). A cistatina-histatina (BOBEK; TSAI; LEVINE, 1993) e a estaterina-osteopontina quimera (GILBERT et al., 2000) são exemplos de tais construções sintéticas bifuncionais no campo das proteínas.

Neste sentido, combinando sinteticamente DR9 com RR14, antecipamos a via de evolução da proteína salivar e hipotetizamos a criação de uma nova proteína com ambas as qualidades de melhorada homeostase mineral e de defesa antimicrobiana. Ainda, ao duplicar o domínio funcional de estaterina (DR9), planejamos criar um peptídeo mais poderoso que atue como um inibidor de cristais de cálcio e fosfato na cavidade bucal.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Saliva

A saliva consiste numa secreção exócrina mucosa clara e ligeiramente ácida, um fluido biológico que banha a cavidade bucal e possui várias e significativas funções na homeostase bucal. A saliva total é uma mistura complexa de fluidos das glândulas salivares maiores (parótidas, submandibulares e sublinguais) e menores (labiais, palatais e linguais), e de fluido crevicular gengival, que contém bactérias bucais e detritos alimentares, além de células epiteliais descamadas e componentes plasmáticos. Para a produção de saliva total, a porcentagem de secreção glandular corresponde aproximadamente a 95,6%, sendo a contribuição do fluido crevicular gengival de 2,4%, a de micro-organismos de 1% e a de células epiteliais de 1%. As secreções serosas são produzidas principalmente a partir da glândula parótida, as secreções mucosas das glândulas menores e as secreções mistas, serosas e mucosas das glândulas sublingual e submandibular (EDGAR, 1992; HUMPHREY; WILLIAMSON, 2001).

As funções da saliva incluem a manutenção de uma mucosa bucal úmida, tornando-a menos suscetível à abrasão e a remoção de micro-organismos, células epiteliais descamadas, leucócitos e detritos de alimentos por deglutição. As mucinas formam um revestimento viscoso em todas as superfícies da boca e atuam como lubrificante durante processos como mastigação, formação de bolo alimentar, deglutição e fala. Ela fornece o fluido em que saborizantes sólidos podem ser dissolvidos e distribuídos em torno da boca para as papilas gustativas. A saliva hipotônica não estimulada facilita o reconhecimento do sabor. A amilase salivar está envolvida na digestão de amidos. A saliva age como um tampão para proteger as mucosas bucais, faríngeas e esofágicas de ácido bucalmente ingerido ou ácido regurgitado do estômago. Ela protege ainda, os dentes contra o ácido, contribuindo para a película adquirida de esmalte, que forma um lubrificante renovável entre superfícies dentárias opostas, se encontrando supersaturada em relação ao mineral do dente, contendo bicarbonato como tampão e ureia e assim, facilitando a depuração de materiais ácidos da boca. A saliva contém muitos agentes

antibacterianos, antivirais e antifúngicos que modulam a flora microbiana bucal de diferentes maneiras, além de facilitar a cicatrização de feridas bucais. Claramente, a saliva tem muitas funções que são necessárias para a proteção adequada e funcionamento do corpo humano (DAWES, 2015).

As secreções das glândulas salivares maiores e menores, juntamente com o fluido crevicular gengival, constituem o fluido bucal ou saliva total que proporciona o meio químico dos dentes e dos tecidos moles bucais. O papel crucial da saliva na manutenção da saúde bucal é demonstrado pela morbidade associada à perda da função das glândulas salivares (EDGAR, 1992).

Um suprimento adequado de saliva é importante para a preservação e manutenção do tecido bucal. Os clínicos muitas vezes não valorizam os muitos benefícios da saliva até que as quantidades sejam diminuídas. Muito é escrito sobre o tema da hipofunção salivar, mas pouca atenção é dada ao fluxo e função salivar normais. A saliva compõe-se de por uma variedade de eletrólitos, incluindo sódio, potássio, cálcio, magnésio, bicarbonato e fosfatos. Encontram-se também na saliva imunoglobulinas, proteínas, enzimas, mucinas e produtos nitrogenados, tais como ureia e amoníaco. Estes componentes interagem nas seguintes áreas gerais: (1) os bicarbonatos, fosfatos e ureia atuam para modular o pH e a capacidade tampão da saliva; (2) as proteínas macromoleculares e mucinas servem para depurar, agregar e ou anexar micro-organismos bucais e contribuir para o metabolismo da placa dentária; (3) cálcio, fosfato e proteínas trabalham juntos como um fator de antissolubilidade e modulam desmineralização e remineralização; e (4) imunoglobulinas, proteínas e enzimas proporcionam ação antibacteriana. A saliva é um fluido muito diluído, composto de mais de 99% de água, mas os componentes iônicos e proteicos por volta de 1% a tornam um fluido viscoelástico, capaz de executar várias funções importantes, com a presença de proteínas específicas como imunoglobulinas, mucinas, histatinas, estaterina, cistatinas e proteínas ricas em prolina (HUMPHREY; WILLIAMSON, 2001).

A "degustação" de um alimento depois de ter sido colocado na boca e a salivação reflexa acompanhada por esse alimento têm vários aspectos diferentes. O termo "gosto/sabor/paladar", usado neste contexto, é um termo impreciso que é usado de várias maneiras para descrever a detecção de moléculas por células

receptoras gustativas, e se refere à descrição da qualidade percebida por um indivíduo após essa detecção e descreve a experiência geral dos alimentos que é muito mais do que estimulação de receptores gustativos, mas também textura, liberação de sabor, e sensação olfativa e bucal, importantes na mastigação e na deglutição. Ao se estimular o fluxo salivar quimicamente (estimulação gustatória) com ácido cítrico, o fluxo gerado é, sem dúvidas, o maior possível. A ordem geral da resposta relativa do fluxo salivar, dos fluxos mais altos para os mais baixos é: o ácido cítrico (azedo) > MSG (umami) > cloreto de sódio (salgado) > sacarose (doce) > = sulfato de magnésio (amargo) (HODSON; LINDEN, 2006).

A literatura sobre ritmos na composição salivar e na taxa de fluxo foi revisada em detalhes por Dawes em 1972, mostrando que uma coleta de saliva estimulada que não influencie a composição da saliva coletada posteriormente, deve ser feita com frequência maior do que a cada 1 ou 2 horas. A presença de ritmos circadianos na taxa de fluxo salivar e na composição deve influenciar o conceito de valores normais e, em qualquer estudo sobre a saliva, a hora do dia da amostragem pode ter uma influência importante nos resultados. A saliva total não estimulada mostrou ritmos circadianos significativos na taxa de fluxo e nas concentrações de sódio e cloreto, mas não em proteína, potássio, cálcio, fosfato ou ureia. E a saliva parótida estimulada apresentou ritmos circadianos significativos nas concentrações de proteína, sódio, potássio, cálcio e cloreto, mas não em fosfato ou ureia. A temperatura bucal mostrou um ritmo circadiano que, como os ritmos salivares, apresentava uma periodicidade de 24h (DAWES, 1972).

Um fluxo salivar não estimulado é muito importante para a saúde da cavidade bucal. A taxa de fluxo salivar não estimulado varia consideravelmente durante o dia e é influenciada por um número de fatores: ritmo circadiano, luz e excitação, hidratação, exercício e estresse. Os estímulos mais importantes para a salivação são aqueles associados a alimentação: mastigação, estímulos gustativos e outros estímulos levando à hipersalivação (ptialismo). As concentrações de sólidos dissolvidos, matéria orgânica e inorgânica, são caracterizadas por ampla variação entre indivíduos e dentro de um único indivíduo. Fatores que influenciam a composição da saliva: taxa de fluxo, contribuição da glândula diferencial, ritmo circadiano, duração e natureza do estímulo e dieta. (EDGAR, 1992).

2.2 Proteínas Salivares

Mais de 40 proteínas e peptídeos antimicrobianos (AMPs) são encontrados na cavidade bucal. Estes AMPs foram organizados em 6 grupos funcionais, um dos quais, AMPs catiônicos, tem recebido grande atenção nos últimos anos por sua promessa como antibióticos potenciais. Foram descritos recentes avanços na compreensão dos diversos mecanismos de ação dos AMPs catiônicos e a resistência bacteriana contra esses peptídeos. O recentemente desenvolvido peptídeo GL13K, um novo revestimento de peptídeo antimicrobiano em titânio, produzido a partir da proteína salivar humana BPIFA2, é usado como um exemplo para ilustrar muitos dos conceitos estudados. A BPIFA2 humana, uma proteína secretora parotídea, solúvel, que tem uma semelhança de sequência com a proteína bactericida, provavelmente está envolvida na resposta antibacteriana na mucosa da cavidade bucal. Os AMPs catiônicos exibem tipicamente uma conformação anfipática, o que permite uma maior interação com membranas bacterianas carregadas negativamente, pois apresentam a característica de possuírem uma região hidrofílica (solúvel em meio aquoso), e uma região hidrofóbica (insolúvel em água, porém solúvel em lipídios e solventes orgânicos). Os peptídeos sofrem alterações na conformação e no estado de agregação na presença de membranas; inversamente, a conformação lipídica e o empacotamento podem adaptar-se à presença de peptídeos. Como consequência, um único peptídeo pode atuar através de vários mecanismos dependendo da estrutura do peptídeo, da razão entre peptídeo e lipídeo e das propriedades da membrana lipídica. As evidências acumuladas mostram que, além de atuarem na membrana celular, os AMPs podem atuar na parede celular, inibir a dobragem das proteínas ou atividade enzimática, ou atuar intracelularmente. Por conseguinte, uma vez que um peptídeo atingiu a parede celular, a membrana celular ou o seu alvo interno, a diferença no mecanismo de ação em bactérias gram-negativas e gram-positivas pode ser menos pronunciada do que anteriormente presumido. Enquanto os AMPs não devem causar resistência generalizada devido ao seu ataque preferencial na membrana celular, nos casos em que alvos proteicos específicos estão envolvidos, existe a possibilidade de mutações genéticas e resistência bacteriana. De fato, o uso clínico potencial de AMPs levantou a preocupação de que a resistência aos AMPs terapêuticos poderia estar associada com resistência a peptídeos endógenos de defesa do hospedeiro. A evidência atual

sugere que este é um evento raro que pode ser superado por modificações estruturais sutis de um AMP (BECHINGER; GORR, 2017).

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

Foi mostrada uma visão translacional do uso dos recentes avanços tecnológicos na pesquisa dentária para prever, monitorar e prevenir o desenvolvimento de doenças bucais, investigando o papel diagnóstico e terapêutico das proteínas salivares. Novas tecnologias analíticas de ponta, como a espectrometria de massa e a microscopia de força atômica, revolucionaram o campo da biologia bucal. Estas novas tecnologias abrem caminhos para uma caracterização abrangente das proteínas salivares seguidas pela avaliação das funções fisiológicas que poderiam possibilitar num futuro próximo o desenvolvimento de uma nova série de proteínas sintéticas para terapêuticas capazes de prevenir doenças bucais globais como a doença periodontal e cárie dentária, as duas doenças bucais mais prevalentes no mundo (VUKOSAVLJEVIC; CUSTODIO; SIQUEIRA, 2011).

Os perfis proteicos de saliva total (WS) diferem significativamente daqueles de secreções salivares glandulares. A proteólise rápida dos membros proeminentes das famílias de proteínas salivares por proteases residentes na WS parece ser uma causa principal para as diferenças observadas. Propôs-se que a taxa e a modalidade de degradação da proteína salivar glandular na cavidade bucal contém informações que poderiam ser de valor único no diagnóstico de doença bucal (HELMERHORST, 2007).

Existe um interesse crescente no uso de saliva total humana para o diagnóstico e monitorização de doenças como uma alternativa às amostras de sangue. Em contraste com o sangue, a saliva total é um fluido corporal não estéril. Manipulação e armazenamento adequados são necessários para preservar a

integridade de potenciais biomarcadores. Assim investigações foram realizadas quanto à degradação autoproteolítica salivar usando uma variedade de abordagens. Determinou-se a inibição das atividades de protease monitorando o proteoma endógeno. Além disso, foi avaliada a estabilidade de proteínas altamente suscetíveis à protease, como histatina 5, estaterina e proteínas acídicas ricas em prolina (PRP). As variáveis experimentais incluíram inibidores de protease, pH salivar, temperaturas de incubação e aquecimento da amostra. Um coquetel contendo AEBSF (Cloridrato de fluoreto de amino-metil-sulfonil), aprotinina, inibidor da tripsina pancreática, leupeptina, antipaina e EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) não conseguiu evitar a degradação da histatina 5, da estaterina ou das proteínas acídicas ricas em prolina (PRP) na saliva total. Entre os outros tratamentos avaliados, o armazenamento a curto prazo de amostras recém colhidas em gelo foi eficaz sem interferir com a química do proteoma. Em conclusão, a saliva total contém uma mistura única de enzimas como evidenciado pela sua resiliência à inibição da protease. É necessária evidência analítica sobre a estabilidade das proteínas para garantir a validade dos resultados do estudo de biomarcadores salivares. A análise dos dados apresentados fornece ajuda e orientação para o uso de amostras de saliva para fins de diagnóstico (THOMADAKI et al., 2011).

Construiu-se anteriormente recombinantes que codificam as formas de comprimento total e truncado de cistatina-SN e expressaram estas no sistema de expressão de *Escherichia coli* pGEX-2T, que expressa sequências estranhas como proteínas de fusão com glutathione S-transferase (GST). As cistatinas recombinantes foram produzidas e purificadas em grandes quantidades. A cistatina-SN recombinante de comprimento total exibiu atividade biológica e estrutura secundária comparáveis à cistatina natural, validando a utilização das proteínas recombinantes de comprimento total e mutantes para estudos de estrutura-função de moléculas salivares. Foram construídos com sucesso recombinantes que codificam as moléculas salivares individuais e quiméricas estas foram expressas eficientemente no sistema de expressão de *Escherichia coli* pGEX-2T. A purificação e a caracterização de proteínas recombinantes de histatina e de proteínas híbridas de cistatina-histatina foram estudadas (BOBEK; TSAI; LEVINE; 1993).

A adsorção de histatina 5 em hidroxiapatita (HA) foi determinada e comparada com a de vários fragmentos de histatina 5, tais como resíduos 1-16

(N16), 7-16 (M10), 9-24 (C16), 11-24 (C14), 13-24 (C12), 15-24 (C10). A influência dos peptídeos adsorvidos no crescimento dos cristais de HA foi investigada com o método de composição constante. A afinidade de adsorção dos peptídeos assim como a sua capacidade para inibir a mineralização foram influenciadas pelo comprimento da cadeia peptídica. A histatina 5 mostrou a maior afinidade, determinada por um modelo de Langmuir, enquanto que C10 e C12 apresentaram a menor absorção de equilíbrio. Os menores peptídeos C10 e C12 foram, por outro lado, mais eficazes como inibidores do crescimento de cristais, indicando uma cobertura mais eficiente dos sítios de superfície ativa. Os dados de mobilidade eletroforética indicaram um aumento na carga positiva na superfície de HA na presença destes peptídeos, que eram eficientes dispersantes de cristalites de HA (RICHARDSON et al., 1993).

As histatinas são proteínas salivares humanas antifúngicas que são propensas à degradação enzimática extensa após a sua liberação na cavidade bucal. Pode esperar-se que a proteólise da histatina, que conduz ao desaparecimento da proteína intacta, tenha consequências funcionais. A histatina 5, que compreende 24 resíduos, é a menor das histatinas salivares mais importantes e a mais ativa em termos das suas propriedades antifúngicas. A taxa e o modo de degradação da histatina 5 foram determinados incubando-se a proteína em sobrenadante de saliva total durante vários intervalos de tempo. Os produtos de fragmentação foram coletados por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (RP-HPLC), caracterizada estruturalmente por espectrometria de massa (MALDI-TOF) e funcionalmente num ensaio de inibição de crescimento fúngico. Dos 19 fragmentos identificados, 16 foram derivados de eventos de clivagem proteolítica única na histatina 5. Um achado notável foi a consistência intersujeitos no padrão de degradação da histatina 5. Apesar da rápida proteólise da histatina 5, a mistura de degradação precoce foi tão ativa em ensaios antifúngicos como a histatina 5 intacta. Foi demonstrado que a proteólise mediada por fluido bucal da histatina 5 representa uma propriedade biológica intrínseca da saliva total. Também foi revelado que a fase de proteólise precoce da histatina 5 não elimina as propriedades antifúngicas associadas a esta proteína (HELMERHORST et al., 2006).

A compreensão da composição e função da película adquirida de esmalte (AEP) tem sido um dos principais objetivos da biologia bucal. Testou-se a hipótese

de que histatinas intactas fazem parte da AEP *in vivo* e que histatinas após adsorção à HA têm efeitos sobre a desmineralização *in vitro* do esmalte. Pela primeira vez demonstrou-se a presença de histatinas intactas na AEP *in vivo*. As experiências mostraram que todas as histatinas que ocorrem naturalmente na AEP têm o potencial de proporcionar algum nível de proteção contra a lesão ácida (SIQUEIRA et al., 2010).

As histatinas são proteínas salivares que apresentam alta afinidade pela hidroxiapatita e contribuem para a película adquirida de esmalte. Estudos anteriores observaram que, apesar da alta atividade proteolítica na saliva, um número significativo de moléculas de histatina na película adquirida de esmalte está intacta. Hipotetizou-se que as histatinas são menos suscetíveis às proteinases presentes na saliva quando adsorvidas na hidroxiapatita. Para testar esta premissa, incubou-se histatina 1 com hidroxiapatita e saliva total humana. Os produtos proteolíticos desta incubação foram então caracterizados por PAGE (Eletroforese em Gel de Poliacrilamida), HPLC (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) e espectrometria de massa. Mostrou-se pela primeira vez que a ligação à hidroxiapatita confere à histatina 1 intacta resistência à degradação proteolítica (MCDONALD et al., 2011).

O número limitado de tratamentos para a candidíase bucal resultou no surgimento de cepas *Candida albicans* resistentes ao azol, reforçando assim a necessidade de novos tratamentos antifúngicos. Embora a histatina 5 (H5) demonstre atividade antifúngica, seu efeito inibitório quando aderido às superfícies de hidroxiapatita e polimetilmetacrilato (PMMA), semelhante às condições da película *in vivo*, permanece inexplorado. Analisou-se um estudo *in vitro* para determinar se a superfície aderida de H5 inibe a colonização de *C. albicans* em hidroxiapatita e/ou PMMA. A análise de *C. albicans* envolveu o desenvolvimento de uma película de mono-proteína (H5 ou albumina) em discos de hidroxiapatita e PMMA, introduzindo *C. albicans* e contando o número de células aderidas, ao longo do tempo, usando microscopia eletrônica de varredura. Para análise estatística utilizou-se um modelo estatístico binomial negativo e o teste de Tukey-Kramer, com $p < 0,01$ indicando significância. O PMMA revestido com H5 tinha reduzido significativamente o número de células em comparação com o PMMA revestido com albumina a 30, 90 e 1440 min ($p < 0,0001$), com o número de células diminuindo significativamente em 90 e 1440 min ($p < 0,0001$). De forma semelhante, a

hidroxiapatita revestida com H5 teve significativamente menos células em comparação com a superfície revestida com albumina a 90 e 1440 min ($p < 0,0001$), com o número de células diminuindo significativamente a 30, 90 e 1440 min ($p < 0,0001$). Concluiu-se que, a colonização de *C. albicans* foi mais inibida por PMMA e hidroxiapatita aderida à H5 após 1440 min, ilustrando o efeito dependente do tempo da H5. Além disso, as células de levedura colonizaram o PMMA revestido com albumina, enquanto que as redes densas de hifas formaram-se em hidroxiapatita revestida com albumina, sugerindo que a morfologia de *C. albicans* é influenciada pela superfície disponível para adesão à albumina (VUKOSAVLJEVIC et al., 2012).

Com o progresso recente na análise do proteoma salivar, o número de proteínas salivares identificadas aumentou dramaticamente. No entanto, as funções fisiológicas de muitas das proteínas recentemente descobertas permanecem obscuras. Estreitamente relacionada ao estudo da função de uma proteína é a identificação de seus parceiros de interação. Investigou-se as interações e funções da histatina 1 e das outras proteínas que estão presentes na saliva usando técnicas de espectrometria de massa de alto rendimento. Isto levou à identificação de 43 proteínas capazes de interagir com a histatina 1. Além disso, descobriu-se que essas interações proteína-proteína protegem parceiros complexos da proteólise e modulam sua atividade antifúngica. Os dados obtidos contribuem significativamente para a caracterização do interactoma salivar, mostrando as interações moleculares que ocorrem através da bioinformática e para a compreensão da biologia de complexos de proteínas salivares (SIQUEIRA et al., 2012),

O sistema de defesa corporal humano inclui uma grande variedade de proteínas antimicrobianas inatas. As histatinas são proteínas de pequeno peso molecular produzidas pelas glândulas salivares humanas que exibem atividades antifúngicas e antibacterianas. Embora as proteínas salivares evolutivamente antigas, tais como mucinas e proteínas ricas em prolina, contenham grandes regiões de repetições em tandem, proteínas relativamente jovens como as histatinas não contêm tais domínios repetidos. Antecipando que duplicações de domínio têm uma vantagem funcional, estudou-se manipulações genéticas de variantes de histatina 3 com uma, duas, três ou quatro cópias do domínio funcional por reação em cadeia da polimerase (PCR) e “splice overlap”. As proteínas resultantes, designadas

reHst3 1-mer, reHist3 2-mer, reHis3 3-mer e reHist3 4-mer, exibiram pesos moleculares de 4,062, 5,919, 7,777 e 9,634 Da, respectivamente. As atividades biológicas destas construções foram avaliadas em ensaios fungicidas para *Candida albicans* blastoconidia e células germinadas. As atividades antifúngicas por mol de proteína aumentaram concomitantemente com o número de domínios funcionais presentes. Este aumento, no entanto, foi maior do que poderia ser antecipado a partir da concentração molar de domínios funcionais presentes nas construções. O aumento demonstrado na atividade antifúngica pode fornecer uma explicação evolutiva por que tal multiplicação de domínios é um acontecimento frequente em proteínas salivares humanas (OPPENHEIM et al., 2012).

Os domínios estruturais da proteína estaterina salivar, responsáveis parcialmente pela proteção e recalcificação do esmalte dentário, foram examinados com relação à carga, sequência, hidrofobicidade, potencial de ligação de hidrogênio e conformação. Vários fragmentos de estaterina, 1-15 (SN15), 5-15 (SN11), 15-29 (SM15), 29-43 (SC15), 19-43 (SC25) e análogos da sequência de 15 resíduos N-terminal, em que as fosfoserinas nas posições 2 e 3 foram substituídas por Ser (SNs15) e Asp (SNA15), respectivamente, foram sintetizados. Determinou-se a capacidade desses fragmentos para adsorver às superfícies de hidroxiapatita (HA) e inibir sua mineralização em soluções supersaturadas e também comparou-se com as da molécula inteira de estaterina, relatada anteriormente. As preferências conformacionais dos fragmentos tanto em soluções aquosas como não aquosas foram examinadas por dicroísmo circular (CD). O fragmento SN15 N-terminal altamente carregado tem a maior adsorção à HA quando comparado com a estaterina e todos os outros fragmentos. Sua atividade inibitória de mineralização é significativamente maior do que a de outros fragmentos e comparável com a da molécula inteira. O fragmento N-terminal desfosforilado SNs15 mostra uma tendência diminuída a aderir e inibir a formação de HA, em comparação com SN15. Contudo, a substituição de resíduos de Asp no lugar das fosfoserinas (SNA15), restaura a afinidade de ligação e as propriedades de inibição de crescimento de cristais, sugerindo que a densidade de carga negativa no N-terminal, mais do que qualquer interação específica do grupo fosfato, é importante para as interações de superfície de HA. Os fragmentos SC15 e SC25 C-terminais produzem uma afinidade muito maior para a superfície HA do que a sequência média (SM15), indicando que

o potencial de ligação de hidrogênio da sequência C-terminal também contribui para a interação da estaterina com HA. Os estudos de CD fornecem evidências de que o fragmento N-terminal SN15 possui uma forte tendência para adotar uma conformação helicoidal ordenada, enquanto que a sequência N-terminal, a do meio e os fragmentos C-terminais são estruturalmente flexíveis e preferem as estruturas de rotação em conformações aleatórias ordenadas em soluções orgânicas e aquosas. Coletivamente, os dados indicam que a densidade de carga negativa, a sequência (1-15) e a conformação helicoidal na região N-terminal da estaterina são importantes para sua interação com a superfície de HA (RAJ et al., 1992).

As proteínas da matriz extracelular desempenham papéis chave no controle das atividades dos osteoblastos e osteoclastos na remodelação óssea. Estas proteínas de matriz extracelular específicas de osso contêm sequências de aminoácidos que medeiam a adesão celular e muitas das proteínas de matriz específicas de osso também contêm domínios ácidos que interagem com a superfície mineral e podem orientar os domínios de sinalização. Foi apresentado um design de peptídeo de fusão que é baseado nesta abordagem natural para a apresentação de sequências peptídicas de sinalização em superfícies biominerais. A estaterina salivar contém um domínio de ligação de hidroxiapatita de 15 aminoácidos (N15) que é frouxamente helicoidal em solução. Para testar se N15 pode servir para orientar sequências peptídicas ativas em hidroxiapatita, o RGD (tripeptídeo Arg-Gly-Asp) e os resíduos laterais da osteopontina foram fundidos ao C-terminal. Os peptídeos de fusão ligaram-se firmemente a hidroxiapatita e o peptídeo N15-PGRGDS mediou a adesão dose-dependente de células de melanoma Mo α v quando imobilizado na superfície de hidroxiapatita. Experiências com uma subpopulação de Mo α v classificada por integrina demonstraram que a integrina $\alpha_v \beta_3$ foi o alvo receptor primário para o peptídeo de fusão. As experiências de espectroscopia por NMR (espectroscopia por Ressonância Magnética Nuclear) de estado sólido mostraram que a porção RGD do peptídeo de fusão hidratado é altamente dinâmica na superfície de hidroxiapatita. Esta estrutura de peptídeo de fusão pode assim proporcionar um modelo direto para imobilizar sequências bioativas em hidroxiapatita para biomateriais, engenharia de tecidos e aplicações de vacinas (GILBERT et al., 2000).

2.3 Película Adquirida do Esmalte (AEP)

A película adquirida de esmalte (AEP) é uma fina película acelular que se forma nas superfícies dos dentes após a exposição ao ambiente bucal. É constituída predominantemente por proteínas salivares, mas também inclui proteínas não salivares, carboidratos e lipídios. Uma vez que é a interface entre os dentes e o ambiente bucal, a AEP desempenha um papel fundamental na manutenção da saúde bucal através da regulação de processos, incluindo lubrificação, desmineralização e remineralização e moldando a composição da flora microbiana precoce aderente às superfícies dentárias. Com o conhecimento da estrutura 3D da AEP e como isso se correlaciona com suas funções protetoras pode fornecer insight sobre vários estados patológicos bucais, incluindo cárie dentária, erosão e doença periodontal. Foram mostradas as descobertas mais recentes relacionadas à formação, ultraestrutura, composição e funções da AEP, bem como o futuro da pesquisa sobre a película, com ênfase particular no papel emergente das técnicas proteômicas e de microscopia no diagnóstico bucal e na terapêutica (SIQUEIRA; CUSTODIO; MCDONALD, 2012).

A formação da película adquirida salivar é o resultado da adsorção do biopolímero na interface dente-saliva. O termo película adquirida foi sugerido pela primeira vez em uma revisão da nomenclatura dos tegumentos de superfície do esmalte por Dawes et al., segundo (HANNIG M; JOINER A, 2006), para descrever o material cuticular formado na superfície do esmalte após a erupção. A película consiste em proteínas adsorvidas e outras macromoléculas do ambiente bucal (saliva, fluidos creviculares) e é claramente distinta do biofilme microbiano (placa). A formação, composição, estrutura, função e propriedade da película adquirida foram analisadas. Especificamente, a formação da película foi considerada em termos de termodinâmica e aspectos cinéticos. A composição da película foi estudada em termos das proteínas, carboidratos e lipídeos que foram identificados usando várias técnicas analíticas. A ultraestrutura da película foi descrita em alguns detalhes em estudos envolvendo “slices” de esmalte na boca, nos quais a película subsequente foi analisada por microscopia eletrônica de varredura (SEM), microscopia eletrônica de transmissão (TEM) e microscopia confocal de varredura a laser (CLSM). A função da película é resumida em termos de suas propriedades lubrificantes, sua habilidade

de atuar como membrana semipermeável e de proteção total das superfícies de esmalte subjacentes. Uma vez que a película é formada na interface entre a superfície do esmalte e o ambiente bucal, o importante processo de adesão bacteriana na superfície da película foi descrito e os lugares de aderência bacteriana específicos encontrados na película foram resumidos. A influência da dieta e da nutrição bem como a formação de manchas extrínsecas, em particular o papel da clorexidina, na camada da película foram considerados. (HANNIG; JOINER, 2006).

Avaliou-se o potencial protetor das películas salivares formadas *in situ* em períodos que variam de 2 a 24 h. Os espécimes de esmalte com e sem películas foram imersos em ácido cítrico (1%) durante 60 s, e a quantidade de cálcio dissolvido foi medida por espectroscopia de absorção atômica. Além disso, os espécimes foram processados para Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM). Não houve diferenças significativas na liberação de cálcio dependentes do tempo de formação da película, mas em comparação com espécimes de esmalte sem película, foi observada uma desmineralização significativamente menor ($p < 0,05$) do esmalte em espécimes cobertos com película. A TEM mostrou que a película foi parcialmente, mas não completamente dissolvida após exposição ao ácido. Concluiu-se que mesmo uma camada de película formada *in situ* de 2 horas protege a superfície do esmalte, até certo ponto, contra a desmineralização (HANNIG et al., 2003)

Investigou-se o tipo e a natureza dos peptídeos presentes na película adquirida de esmalte humano formados *in vivo*. O material de película foi recolhido e submetido a preparações de amostras consistindo em filtração centrífuga utilizando uma membrana de corte de peso molecular de 10 kDa e cromatografia de filtração em gel de alta resolução. As frações contendo peptídeos < 10 kDa, obtidos por ambos os métodos, foram analisadas por LC-ESI-MS/MS. Foram identificados 78 peptídeos de película natural com pesos moleculares que variam de 766,9 Da a 3981,4 Da originados de 29 proteínas diferentes. O número de peptídeos presentes na película adquirida de esmalte parece ser grande e isto é provável de aumentar o espectro funcional deste filme de proteína. A presença de pequenos peptídeos na película pode ser funcionalmente importante, uma vez que estudos de estrutura e função de muitas proteínas salivares mostraram que domínios específicos dentro destas proteínas nativas retêm ou mesmo exibem atividades biológicas aumentadas. Os

dados apresentam a base para a determinação da função precisa destes peptídeos peliculares e para a obtenção de insights sobre o papel que a película representa na cavidade bucal (SIQUEIRA; OPPENHEIM, 2009).

2.4 Cristais de Hidroxiapatita

A cinética de crescimento de hidroxiapatita foi estudada a 25°C e a um pH fisiológico constante, espalhando cristais nas soluções estáveis de fosfato de cálcio supersaturado. Os cristais foram caracterizados por análise química e pelos métodos de difração de raios-X e Espectroscopia no Infravermelho (IR). O pH foi mantido constante por meio de um pH-stat e o crescimento foi seguido por monitorização da absorção de álcali e da alteração da solução de cálcio e de concentração de fosfato. Durante os primeiros 60-90 minutos, o crescimento prossegue através da formação de uma fase precursora que tem uma razão de cálcio : fosfato de $1,45 \pm 0,05$. A fase precursora sofre uma interação lenta com o meio para atingir a composição de hidroxiapatita. As taxas iniciais de crescimento são independentes da velocidade de agitação, dependendo da concentração e supersaturação de cristais. Tentativas foram feitas para descrever a taxa de crescimento em termos das concentrações de espécies iônicas livres nas soluções (NANCOLLAS; MOHAN, 1970).

Vários tipos de depósitos nos dentes foram encontrados na maioria dos indivíduos. Embora a cutícula dentária exógena possa ser considerada fisiologicamente normal, os depósitos celulares, como placa, matéria alba e cálculos dentários, devem ser classificados como manifestações patológicas bucais. Sabe-se muito pouco sobre o processo intrabucal que leva à formação de depósitos dentários, ou favorece seu desenvolvimento. Os principais fatores envolvidos na formação dos depósitos dentários são os fluidos bucais (saliva, secreção das glândulas mucosas menores e das bolsas gengivais) e a flora bucal microbiana. Fatores externos que podem ter uma influência sobre o desenvolvimento desses depósitos são a dieta e a qualidade da higiene bucal. Qualquer discussão sobre o significado desses fatores e seu modo de ação, naturalmente, nos induzirá a formular questões clínicas e decisivas, como por exemplo de que tipo são as condições bucais prevalentes em indivíduos que tendem a formar depósitos e de

que tipo são essas condições nos casos raros de indivíduos que quase não produzem depósitos celulares. O papel desempenhado pelos fluidos bucais na formação dos cálculos dentários e da placa foi estudado, em questionamento se a formação dos cristais de fosfato de cálcio depende de uma atividade microbiana específica e qual a importância dos polissacarídeos na placa (SCHROEDER, 1969).

As interações entre mucinas humanas submandibular e sublingual de baixo peso (MG2) e alto peso (MG1) e a hidroxiapatita humana (HA) foram comparadas usando um ensaio quantitativo. Os dados obtidos parecem empiricamente ajustar-se à isoterma de adsorção de Langmuir. Constantes de afinidade aparentes derivadas desta isoterma indicaram que MG1 tinha uma maior afinidade para HA do que MG2. Os estudos de inibição revelaram que os glicolípidos salivares inibiram a interação de MG1 e HA sem influenciar a adsorção de MG2. Em contraste, a adsorção de MG2 a HA foi marcadamente inibida por frações de fosfoproteína salivar contendo cisteína. Os dados indicaram que MG1 e MG2 se diferem em suas interações com HA (TABAK et al., 1985).

Estudos *in vitro* demonstraram que a fosfoproteína osteopontina (OPN) inibe a nucleação e o crescimento de hidroxiapatita (HA) e outros biominerais. *In vivo*, acredita-se que o OPN previne a calcificação dos tecidos moles. No entanto, a natureza da interação entre OPN e HA não é compreendida. Simulações de dinâmica molecular foram realizadas para prever a adsorção de 19 peptídeos, cada um com 16 aminoácidos de comprimento e cobrindo coletivamente toda a sequência de OPN, para a face {100} de HA. Mostrou-se que há uma relação inversa entre a força prevista de adsorção e o ponto isoelétrico peptídico ($P < 0,0001$). A análise da sequência de OPN por PONDR (Preditor de Regiões Naturalmente Desordenadas) indicou que as sequências de OPN previstas para adsorverem bem à HA são altamente desordenadas. Na parte experimental, sintetizou-se peptídeos fosforilados e não fosforilados correspondentes às sequências de OPN 65-80 (pSHDHMDDDDDDDDGD) e 220-235 (pSHEpSTEQSDAIDpSAEK). De acordo com a análise PONDR, mostrou-se que, por espectroscopia de dicroísmo circular estes foram largamente desordenados. Utilizou-se um ensaio de crescimento de cristais e composição constante para avaliar as potências inibidoras de HA dos peptídeos sintéticos. As versões fosforiladas de OPN65-80 ($IC_{50}=1,93\mu\text{g/mL}$) e OPN220-235 ($IC_{50}=1,48\mu\text{g/mL}$) são potentes inibidoras do

crescimento de HA, tal como a versão não fosforilada de OPN65-80 ($IC_{50}=2,97\mu\text{g/mL}$); a versão não fosforilada de OPN220-235 não tem atividade inibidora mensurável. Esses achados sugerem que a adsorção de proteínas ácidas nas faces de cristal enriquecidas com Ca^{2+} de biominerais é governada por eletrostática e é facilitada pela flexibilidade conformacional da cadeia polipeptídica (AZZOPARDI et al., 2010).

Estudos recentes mostraram que a película adquirida de esmalte *in vivo* é uma sofisticada estrutura biológica contendo uma porção significativa de peptídeos salivares que ocorrem naturalmente. De um aspecto funcional, a identificação de peptídeos na película adquirida de esmalte é de interesse porque muitas proteínas salivares exibem domínios funcionais que mantêm as atividades da proteína nativa. Entre os peptídeos de película adquirida de esmalte *in vivo* que foram recentemente identificados, 5 peptídeos são derivados da estaterina. Avaliou-se a capacidade desses peptídeos de estaterina da película de inibirem o crescimento de cristais de hidroxiapatita. Além disso, simulações de dinâmica molecular atômica (MD) foram realizadas para compreender melhor os mecanismos físicos subjacentes à inibição do crescimento da hidroxiapatita. Foi utilizado um ensaio colorimétrico de microplaca para quantificar o crescimento de hidroxiapatita. Foram analisados, a proteína estaterina, 5 peptídeos derivados de estaterina, e um peptídeo sem fosfato nos resíduos 2 e 3. O peptídeo de estaterina fosforilado nos resíduos 2 e 3 indicou um efeito inibitório significativo quando comparado com os outros 5 peptídeos ($P < 0,05$). As simulações de MD mostraram uma forte afinidade e adsorção rápida a hidroxiapatita para fosfopeptídeos, enquanto que os peptídeos não fosforilados interagiram fracamente com a hidroxiapatita. Esses dados sugerem que a presença de um grupo fosfato covalentemente ligado (nos resíduos 2 e 3) em peptídeos de estaterina modula o efeito da inibição do crescimento de hidroxiapatita. Forneceu-se um mecanismo para explicar a composição e a função dos peptídeos de estaterina na película adquirida de esmalte que contribuirão como base para o desenvolvimento de peptídeos sintéticos biologicamente estáveis e funcionais para uso terapêutico contra cárie dentária ou doença periodontal (XIAO et al., 2015).

A microscopia de interferência confocal de varredura (SCIM) é uma técnica óptica que permite a visualização de estruturas abaixo dos limites da

microscopia óptica clássica ($\ll 250$ nm). Em 2006, realizou-se o primeiro uso de SCIM para analisar a formação de cristais de oxalato de cálcio, o principal constituinte de cálculos renais. Os cristais foram nucleados e cresceram no fundo de placas de Petri de vidro na presença e ausência do ácido poli-l-aspártico (poli-asp) inibidor de polieletrólito. Na ausência de poli-asp, mono-hidrato de oxalato de cálcio monoclinico (COM) nucleou a partir de faces $\{100\}$ ou $\{010\}$. As primeiras partículas observadas tinham 70-120 nm de diâmetro e cresciam por uma progressão escalonada nas direções $[001]$ e $[010]$. A adição de poli-asp teve vários efeitos na formação de oxalato de cálcio. Primeiro, o número de partículas foi aumentado, mas seus tamanhos foram diminuídos. Em segundo lugar, a taxa de crescimento do COM na direção $[001]$ diminuiu para uma extensão maior do que a taxa ao longo de $[010]$. Em terceiro lugar, a formação de cristais de oxalato de cálcio di-hidratado (COD) tetragonal foi favorecida. Em quarto lugar, as taxas de crescimento do COD ao longo de $\langle 110 \rangle$ e direções aliadas foram diminuídas, enquanto que o paralelo a $\langle 001 \rangle$ foi aumentado. Sequências de frentes de crescimento altamente resolvidas mostraram deslocamento de passo a passo do COM e bordas de cristal em movimento do COD. A análise de sequências de imagens sugeriu que o crescimento foi fortemente afetado por processos concorrentes e alternados, nos quais os processos de difusão são limitadores de taxa e induzem crescimento não-linear. Mostrando que o SCIM é uma poderosa técnica para a análise quantitativa dos processos de cristalização e para a determinação do modo de ação dos inibidores (GROHE et al., 2006).

Estudos das proteínas associadas aos minerais têm sido desenvolvidos com a finalidade de regular muitos aspectos da biomineralização, incluindo a localização, o tipo, a orientação, a forma e a textura dos cristais. Para entender como as proteínas alcançam este nível requintado de controle, estudou-se a interação entre a fosfoproteína osteopontina (OPN) e o biomineral oxalato de cálcio mono-hidratado (COM). Foram sintetizados peptídeos correspondentes aos aminoácidos 220-235 de osso de rato OPN (pSHEpSTEQSDAIDpSAEK), uma das várias sequências altamente fosforiladas, aspárticas e ricas em ácido glutâmico encontradas na proteína. Para investigar o papel da fosforilação na interação com cristais, foram preparados peptídeos contendo zero (P0), um (P1) ou todos os três (P3) fosfatos. Utilizando uma nova combinação de microscopia confocal e microscopia eletrônica de varredura, mostrou-se que estes peptídeos adsorvem-se

preferencialmente às faces {100} do COM e inibem o crescimento dessas faces de uma forma dependente de fosforilação. Para caracterizar o mecanismo de adsorção de peptídeos de OPN ao COM, realizou-se a primeira simulação de dinâmica molecular em escala atômica de uma interação proteína-cristal. P3 adsorve na face {100} muito mais rapidamente do que P1, que por sua vez adsorve mais rapidamente do que P0. Em todos os casos, o ácido aspártico e glutâmico, e não a fosfoserina, são os aminoácidos que estão em contato mais próximo com a superfície do cristal. Identificou-se um motivo de adsorção face específica do COM em OPN e delineou-se papéis separados para grupos carboxilato e fosfato na inibição do crescimento de cristais por fosfoproteínas associadas a minerais. Foi proposto que a formação de interações de curto alcance, estáveis e face-específicas foram um fator chave na capacidade das fosfoproteínas de regular os processos de biomineralização (GROHE et al., 2007).

Para se obter mais informações sobre as relações de estrutura-função das proteínas que agem nos processos de biomineralização ectópica na formação de cálculos renais, estudou-se a capacidade de proteínas urinárias (proteína de Tamm-Horsfall, osteopontina (OPN), fragmento de protrombina 1 (PTF1), bikunina, lisozima, albumina, fetuina-A) e compostos modelo (um fragmento de bikunina, recombinante, leite, osteopontina óssea, ácido poli-l-aspártico (poli-asp), ácido poli-l-glutâmico (poli-glu)) em modular as reações de precipitação de mono e di-hidratos de oxalato de cálcio (COM, COD) relacionados com cálculos renais. Combinando microscopia confocal de varredura e imagens de fluorescência, determinou-se as faces dos cristais do COM com as quais estes polipeptídeos interagem; utilizando microscopia eletrônica de varredura, caracterizou-se seus efeitos nos hábitos dos cristais e nos volumes precipitados. Foi demonstrado que a adsorção de polipeptídeo a cristais do COM é ditada primeiramente pela afinidade do polipeptídeo pelo cristal seguido por sua preferência por uma face de cristal: as macromoléculas básicas e relativamente hidrofóbicas não mostram adsorção, enquanto os polipeptídeos ácidos e mais hidrofílicos adsorvem não especificamente a todas as faces do COM, ou preferencialmente nas arestas {100} / {121} e nas faces {100}. No entanto, a investigação de oxalatos de cálcio cultivados na presença destes polipeptídeos mostrou que algumas proteínas ácidas que adsorvem a cristais não afetam a cristalização, mesmo se estiverem presentes em excesso de

concentrações fisiológicas. Estas proteínas (albumina, bikunina, PTF1, OPN recombinante) têm hidrofílicidades totais estimadas de 200 a 850 kJ/mol e cargas negativas líquidas de -9 a -35, talvez representando uma "janela" na qual as proteínas adsorvem e cobrem os cristais urinários (apoio à excreção) sem afetar a cristalização. Os efeitos mais fortes na cristalização foram observados para polipeptídeos que são altamente hidrofílicos (>950 kJ/mol) e altamente carboxilados (poli-asp, poli-glu), ou então altamente hidrofílicos e altamente fosforilados (isoformas nativas de OPN), sugerindo que proteínas altamente hidrofílicas afetam fortemente processos de precipitação no trato urinário. Portanto, o nível de hidrofílicidade e carga líquida é um fator crítico na capacidade dos polipeptídeos afetarem a cristalização e regularem os processos de biomineralização (GROHE et al., 2009).

Um experimento *in vitro* utilizando tampões ácidos orgânicos como meios desmineralizantes mostrou que podem ser obtidas lesões de cárie muito semelhantes em morfologia e estágios de desenvolvimento a lesões precoces formadas naturalmente em condições bucais. O uso destes sistemas químicos e de modelos mecânicos avançou para explicar as características histológicas únicas das cáries incipientes permitindo uma boa compreensão dos processos envolvidos na formação de cárie. O estudo de fatores naturais e induzidos que influenciam o processo de desmineralização foi bastante facilitado pelo uso de sistemas bacteriológicos nos quais a desmineralização é produzida pela colonização direta de micro-organismos cariogênicos nas superfícies dos dentes extraídos. A comparação dos resultados obtidos com esses últimos sistemas e com sistemas químicos permitiu, por exemplo, elucidar o mecanismo pelo qual as películas adquiridas salivares e as soluções tópicas de fluoreto diminuem a taxa de desmineralização do esmalte. A película retarda o transporte da matéria através da superfície do esmalte, enquanto que as soluções tópicas de fluoreto diminuem a cariogenicidade das bactérias colonizadoras (MORENO; ZAHRADNIK, 1979).

Um modelo de formação de lesão subsuperficial no esmalte dentário foi apresentado, que leva em consideração a química do fosfato de cálcio conhecida e os processos de transporte que ocorrem dentro do esmalte e através da interface superfície-solução de esmalte. A desmineralização subsuperficial existente com a presença de uma camada de esmalte relativamente intacta, sobre uma zona de

desmineralização, foi devido o resultado de processos de reprecipitação que ocorrem dentro da camada superficial do esmalte conforme os íons dissolvidos provenientes da região abaixo da superfície se difundem na superfície do esmalte e através da interface superfície-solução do esmalte. Duas condições devem ser cumpridas, no entanto, para formar a camada intacta. Primeiramente, a taxa à qual os íons se difundem através da interface superfície-solução de esmalte não excede a taxa dos processos de reprecipitação previstos. Essa taxa é efetivamente controlada pelo nível de saturação dos meios de desmineralização em relação ao mineral de esmalte. O segundo requisito é que as condições apropriadas estejam presentes dentro da superfície do esmalte que suportam os processos de reprecipitação. Apresentou-se uma hipótese de trabalho que afirma que as soluções de desmineralização que suportam a formação de fosfato dicálcico di-hidratado dentro da superfície do esmalte irá promover a formação de lesões subsuperficiais sob condições cinéticas apropriadas. Observou-se que o modelo proposto foi consistente com as observações experimentais (MARGOLIS; MORENO, 1985).

O conceito de pH crítico para a dissolução do esmalte em fluidos bucais foi discutido. O pH crítico não tem um valor fixo, mas é inversamente proporcional às concentrações de cálcio e fosfato na solução. Discutiu-se também, porque os dentes se dissolvem em ácido, porque a remineralização de lesões de cárie de mancha brancas é possível e porque a remineralização de dentes que sofreram erosão por ácido não é possível. O pH crítico é o pH ao qual uma solução é apenas saturada em relação a um mineral particular, como o esmalte dentário. Se o pH da solução estiver acima do pH crítico, então a solução é supersaturada em relação ao mineral, e mais mineral tenderá a precipitar-se. Por outro lado, se o pH da solução for inferior ao pH crítico, a solução é insaturada e o mineral tende a se dissolver até a solução ficar saturada. Em uma lesão de cárie de mancha branca, a descalcificação ocorreu abaixo da superfície, e a lesão é coberta por uma zona de superfície praticamente intacta de esmalte. Existe uma boa evidência clínica de que tais lesões podem ser remineralizadas se a superfície permanecer intacta, desde que sejam mantidas livres de placa, com um fluxo salivar adequado ou estimulado regularmente pelo uso de goma de mascar sem açúcar e tratamentos tópicos de fluoreto forem dados. Essa remineralização pode ocorrer apenas porque a saliva e o fluido da placa são normalmente supersaturados em relação ao mineral dentário, particularmente

quando o fluxo salivar é estimulado e porque a lesão subsuperficial fornece uma matriz adequada para o crescimento de cristais, depois que os íons de cálcio e fosfato passaram através da película e do esmalte superficial. Em contraste, o esmalte que sofreu erosão superficial por ácido não pode ser recalcificado porque não existe uma matriz adequada para o crescimento de cristais. Uma superfície de esmalte erodida por ácido torna-se coberta por uma película de esmalte adquirida de proteínas salivares e bacterianas, assim que entra em contato com a saliva, e esta película inibe a deposição mineral. Se a saliva entrar em contato com o esmalte após a corrosão ácida, a película que se forma também reduz a força da ligação à resinas compostas. Além disso, a presença da película de esmalte evita que os dentes se ampliem continuamente, mesmo que estejam banhados em saliva supersaturada com mineral dentário. Assim, contrariamente a alguns pontos de vista, erosão do esmalte é irreversível, razão pela qual é tão importante para os dentistas verificar a ocorrência e, assim, permitir que os pacientes tomem as medidas adequadas para reduzir a exposição dos seus dentes ao ácido (DAWES, 2003).

A formação, desenvolvimento e dissolução de depósitos duros como o cálculo são processos complexos que envolvem numerosas fases de fosfato de cálcio, bem como a interação desses íons com moléculas orgânicas. Embora a formação seja determinada por forças motrizes termodinâmicas, os fatores cinéticos são também determinantes importantes para a precipitação de fases específicas de fosfato de cálcio. O processo global, portanto, pode envolver a formação de intermediários metaestáveis que podem subsequentemente transformar-se nos depósitos duros mais estáveis observados *in vivo*. Um conhecimento da cinética de crescimento de ambas as fases individuais de fosfato de cálcio e suas misturas é importante para elucidar o mecanismo de formação de cálculos. Embora as proteínas salivares sejam inibidores eficazes das reações de mineralização que ocorrem na placa dentária, uma vez adsorvidas, sua conformação pode mudar para apresentar superfícies que catalisam a nucleação de fases minerais. As condições de pH variáveis na placa, expressas em termos de concentrações iônicas livres, irão alterar significativamente as supersaturações em relação às fases precursoras de fosfato de cálcio típicas, tais como di-hidrato de fosfato dicálcico (DCPD) e fosfato octacálcico (OCP). Estudos físico-químicos têm demonstrado que a mineralização de todas as fases de fosfato de cálcio é controlada por reações na superfície, em

vez de por difusão de íons da rede através da fase líquida de contato. Isto torna as taxas de reação muito sensíveis a íons e moléculas na solução que podem absorver nos locais de crescimento ativo e, embora não se incorpore significativamente nas fases de cristal precipitadas, influencia de forma marcante as taxas de mineralização e desmineralização (NANCOLLAS; JOHNSON, 1994).

O cálculo dentário é formado por componentes inorgânicos e matriz orgânica. A parte mineral do cálculo dentário é formada por: brushite, fosfato dicálcico dihidratado, fosfato octacálcico, hidroxiapatita e whitlockite. As proteínas salivares adsorvem-se seletivamente na superfície do dente para formar uma película adquirida. É seguida pela aderência de vários micro-organismos bucais. Fimbriae, flagella e algumas outras proteínas de superfície são essenciais para a aderência microbiana. A coagregação microbiana e a coadesão permitem que alguns microrganismos, que são incapazes de aderir, sejam aderidos à superfície do dente revestida com película. Uma vez que os organismos se ligam à superfície do dente, novos genes podem ser expressos de modo que a placa dentária madura possa se formar e as bactérias de biofilme assumam maior resistência aos agentes antimicrobianos. A supersaturação da saliva e do fluido da placa em relação aos fosfatos de cálcio é a força motriz para a mineralização da placa. Tanto a taxa de fluxo salivar quanto o pH da placa parecem influenciar o grau de saturação de fosfatos de cálcio. Os fosfolipídeos ácidos e os proteolipídeos específicos presentes nas membranas celulares desempenham um papel chave na mineralização microbiana. São discutidos os papéis dos inibidores de crescimento do cristal, promotores e ácidos orgânicos na formação de cálculos. A aplicação de sistemas de cultura de biofilme na mineralização da placa foi revista de forma concisa. Os agentes anticálculos utilizados (centrando no triclosan e polivinil metil éter/ácido maleico copolímero, pirofosfato e polivinil metil éter/ácido maleico copolímero e íon de zinco) em dentifrícios comerciais também estão sendo estudados (JIN; YIP, 2002).

2.5 Proteoma Salivar

O diagnóstico salivar para doenças bucais e sistêmicas depende da identificação de biomoléculas que reflitam uma alteração característica na presença, ausência, composição ou estrutura dos componentes da saliva encontrados em condições saudáveis. A maioria dos biomarcadores adequados para o diagnóstico compreendem as proteínas e peptídeos. A utilidade das proteínas salivares para o diagnóstico requer o reconhecimento de características típicas, que tornam a saliva um fluido corporal único. As secreções salivares refletem um grau de redundância manifestado por polimorfismos extensos que formam famílias para cada uma das proteínas salivares principais. As diferenças estruturais entre estas isoformas polimórficas variam de distintas a sutis, o que pode em alguns casos não afetar a massa de diferentes elementos da família. Para facilitar o uso de métodos proteômicos de ponta e o desenvolvimento de abordagens analíticas baseadas em nanotecnologia no campo do diagnóstico, as principais características das principais famílias de proteínas salivares são revistas em nível molecular. O conhecimento da estrutura e função das proteínas e peptídeos derivados das glândulas salivares tem um impacto crítico na identificação rápida e correta de biomarcadores, quer sejam originários de fontes exócrinas ou não exócrinas (OPPENHEIM et al., 2007).

A compreensão da composição e estrutura da película adquirida de esmalte (AEP) tem sido um dos principais objetivos da biologia bucal. Estudos foram conduzidos sobre a composição da AEP formada em esmalte permanente. A exploração exaustiva forneceu uma identificação abrangente de mais de 100 proteínas de AEP formadas em esmalte permanente. A AEP formada no esmalte decíduo não foi submetida ao mesmo escrutínio de caracterização bioquímica que o esmalte permanente, apesar do esmalte decíduo ser estruturalmente diferente do esmalte permanente. Hipotetizou-se que o proteoma e peptidoma de AEP formados no esmalte decíduo também podem ser compostos de proteínas únicas, algumas das quais podem não ser comuns com AEP de esmalte permanente explorado anteriormente. O material de película foi colhido de 10 crianças (com idade entre 18-54 meses) e submetido a análise de espectrometria de massa. Um total de 76 proteínas de película foram identificadas a partir do proteoma de película decídua. Adicionalmente, foram identificados 38 peptídeos naturais da AEP a partir de 10

proteínas, sugerindo que o proteoma e o peptidoma primário da AEP apresenta uma composição proteômica única. Foi o primeiro estudo a fornecer uma investigação abrangente de AEP *in vivo* formada no esmalte decíduo (ZIMMERMAN et al., 2013).

O proteoma da saliva total, em contraste com o do soro, é altamente suscetível a uma variedade de processos fisiológicos e bioquímicos. Deve-se analisar a saliva total como um fluido muito dinâmico. Em primeiro lugar, a secreção da proteína salivar está sob controle neurológico, sendo a produção de proteínas dependente do estímulo. Em segundo lugar, modificações extensas da proteína salivar ocorrem no ambiente bucal, onde uma infinidade de enzimas derivadas de hospedeiro e bactérias atuam em proteínas que são emanadas dos dutos glandulares. A biossíntese de proteínas salivares inicia-se com a transcrição e translação de genes de proteínas salivares nas glândulas, seguido de processamento pós-translacional envolvendo a glicosilação, fosforilação e proteólise da proteína. Isto dá origem a proteínas salivares que ocorrem em famílias, consistindo em membros intimamente relacionados estruturalmente. Uma vez que as secreções glandulares entram no ambiente bucal não estéril, as proteínas são sujeitas a modificações de proteína adicionais e contínuas, levando a clivagem proteolítica extensa, desglicosilação parcial e formação de complexo proteína-proteína. Todas essas modificações de proteínas ocorrem num ambiente dinâmico ditado pelo fornecimento contínuo de proteínas recentemente sintetizadas e remoção por deglutição. Compreender o proteoma da saliva total em um ambiente de circulação contínua será um pré-requisito para se obter uma visão dos processos fisiológicos e patológicos relevantes para a saúde bucal e ser crucial para a identificação de biomarcadores significativos para a doença bucal (HELMERHORST; OPPENHEIM, 2007).

Foi demonstrado experimentalmente o uso de um calculador versátil de pI de peptídeo, isto é, um calculador de pI desenvolvido internamente que leva em consideração a modificação pós-translacional de proteínas (PTM), tal como fosforilação e acetilação N-terminal. O calculador foi utilizado para um grande conjunto de peptídeos, utilizando a focalização isoeletrica de peptídeos (IEF), pelo que se poderia estabelecer uma boa correlação entre o pI calculado (teórico) e o experimental. Tal calculador permite a implementação de valores pK ótimos dependendo das condições experimentais e de um cálculo confiável de pI de

peptídeo que pode ser utilizado como uma técnica de filtragem na validação de identificações peptídicas. Os dados revelam que a mudança devida a uma fosforilação ou acetilação N-terminal é altamente dependente da presença de resíduos ácidos ou básicos no peptídeo. Além disso, utilizando esse calculador de pI, revelou-se previamente pKs específicos de posição previamente desconhecidas de asparagina e cisteína carbamidometilada dependendo da sua localização no peptídeo. Coletivamente, esse calculador de pI de peptídeo é uma adição bem-vinda à versatilidade e robustez do IEF para a separação e identificação confiáveis de peptídeos pós-translacionalmente modificados (GAUCI et al., 2008).

3 PROPOSIÇÃO

3 PROPOSIÇÃO

Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito de peptídeos sintéticos, que são encontrados de forma natural na película adquirida do esmalte, sobre a formação de cristais de cálcio e fosfato. Para isso, foram utilizados dois peptídeos, sendo um o análogo do domínio funcional da estaterina (DR9) e outro o análogo derivado da histatina 3 (RR14). Além disso, foi testado o efeito da união ou duplicação destes domínios funcionais sobre o crescimento de cristais de hidroxiapatita.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Caracterização de peptídeos peptidomiméticos

Os peptídeos peptidomiméticos derivados de domínios funcionais de estaterina e histatina 3, DR9, RR14, DR9-DR9 e DR9-RR14, foram sintetizados quimicamente pela empresa Chinapeptide (Shanghai, China). Todos os peptídeos estão listados na Tabela 1. A pureza (> 95%) e peso molecular (MW) das proteínas e de cada peptídeo foram verificados por análise de cromatografia líquida de alta performance. Além disso, as proteínas estaterina e histatina 3 também foram sintetizadas quimicamente pela Chinapeptide e adicionadas a este estudo como proteínas de controle positivo e de controle negativo, respectivamente.

Tabela 1 - Peptídeos peptidomiméticos derivados de estaterina e histatina 3

PEPTÍDEOS	Sequência de aminoácidos	Número de resíduos	MW
DR9	DSpSpEEKFLR	9	1270.10
DR9-DR9	DSpSpEEKFLRDSpSpEEKFLR	18	2522.38
RR14	RKFHEKHSHRGYR	14	1875.10
DR9-RR14	DSpSpEEKFLRRKFHEKHSHRGYR	23	3127.29
Estaterina	DSpSpEEKFLRRIGRFGYGYGPYQPVEQPLYQPYPYQPQQYTF	43	5380.00
Histatina 3	DSHAKRHHGYKRKFHEKHSHRGYRSNYLYDN	32	4061.62

MW, peso molecular

4.2 Cálculo de Pontos Isoelétricos de Peptídeos

Os pontos isoelétricos (pI) dos peptídeos construídos estaterina e histatina 3 foram determinados usando a calculadora desenvolvida por Gauci e colaboradores, 2008. Esta abordagem calcula o pI de uma proteína e de um peptídeo a um pH particular, usando valores de pK especificados pelo usuário. O

cálculo é repetido até encontrar o pH correspondente a uma carga líquida de zero. Os valores de pI foram calculados usando a opção Scansite.

4.3 Ensaio de inibição da HA em Placa de Microtitulação

Uma placa de microtitulação de 96 poços foi revestida com 80 μ L de peptídeos (intervalo de 0,9 a 9 μ M) num tampão contendo 50 mM de HEPES, 150 mM de NaCl e pH 7,4 à temperatura ambiente (RT) durante 1 h. Em seguida, foram adicionados a cada poço 10 μ L de uma solução contendo 10 mM de KH_2PO_4 , 20 mM de Na_2HPO_4 , 150 mM de NaCl, pH 7,4 e 10 μ L de uma segunda solução contendo 50 mM de $CaCl_2$, 50 mM de HEPES, 150 mM de NaCl, pH 7,4. A solução resultante de 100 μ L foi incubada à RT durante 4 h para a formação de cristais de HA. Após este período, a solução foi cuidadosamente removida usando uma micropipeta, mantendo os cristais de HA no fundo do poço. Adicionou-se 5% de Alizarina Red S, pH 4,2 e incubou-se durante 1 min para corar os íons de cálcio presentes nos cristais de HA. Imediatamente depois disto, a solução corada foi removida usando uma micropipeta e foram adicionados 100 μ L de cloreto de cetilpiridínio, 100 mM a cada poço e incubados à RT durante 1 h. Um poço de amostra de controle foi realizado da mesma maneira que descrito neste parágrafo, com exceção de não conter nenhuma proteína ou peptídeo. Os íons de cálcio dos cristais de HA formados durante o experimento foram analisados espectrofotometricamente a 560 nm usando um leitor de microplacas para avaliar o efeito dos peptídeos testados na inibição de HA (XIAO et al., 2015). Adicionalmente, o valor IC_{50} foi calculado para todos os peptídeos construídos testados.

Um experimento adicional foi realizado para verificar o potencial efeito sinérgico da inibição do crescimento de cristal de hidroxiapatita quando DR9 e RR14 compartilham o mesmo ambiente. Uma solução tampão contendo 50 mM de HEPES e 150 mM de NaCl, pH 7,4 à RT com um número igual de moléculas DR9 e RR14 foi incubada durante 1 hora. Foram utilizadas aqui as concentrações finais variando de 0,9 a 9 μ M. Após estas incubações peptídicas iniciais, as experiências de inibição do crescimento de cristais de hidroxiapatita foram realizadas nas mesmas condições descritas acima (XIAO et al., 2015).

4.4 Análise estatística

Os testes ANOVA e Student-Newman-Keuls (SNK), teste de comparações múltiplas, foram realizados para analisar os valores entre os grupos de peptídeos. O nível de significância foi estabelecido com um valor de $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5 RESULTADOS

Os pontos isoelétricos foram calculados para cada peptídeo em pH 6,8, um pH salivar fisiológico. O DR9, o peptídeo natural da estaterina, apresentou um *pI* de 3,63, enquanto o DR9-DR9 atingiu o valor *pI* mais baixo, de 3,44. O RR14 mostrou o valor mais elevado de 11,00. O peptídeo híbrido, DR9-RR14, mostrou um valor de 7,16. Esses valores são demonstrados na Tabela 2.

Tabela 2 - Peptídeos construídos derivados de estaterina e histatina 3 e seus *pI* calculados. *Nota.* Sp é uma serina fosforilada.

PEPTÍDEOS	Sequência de aminoácidos	Nº De Resíduos	MW	<i>pI</i>
DR9	DSpSpEEKFLR	9	1270.10	3.63
DR9-DR9	DSpSpEEKFLRDSpSpEEKFLR	18	2522.38	3.44
RR14	RKFHEKHSHRGYR	14	1875.10	11.00
DR9-RR14	DSpSpEEKFLRRKFHEKHSHRGYR	23	3127.29	7.16
Estaterina	DSpSpEEKFLRRIGRFGYGYGPYQPVEQPLYPQPYQPQYQQYTF	43	5380.00	4.41
Histatina 3	DSHAKRHHGYKRKFHEKHSHRGYRSNYLYDN	32	4061.62	9.99

MW, peso molecular; *pI*, ponto isoelétrico

Em relação ao efeito inibitório do crescimento de cristais de HA, a Tabela 3 resume a inibição da formação de cristais de HA por todos os peptídeos testados na faixa de 0,9 a 9 μM , comparando esses peptídeos na mesma concentração. O DR9-DR9 demonstrou um significativo efeito inibitório mais forte quando comparado com os outros peptídeos e proteínas testados em todas as concentrações avaliadas (Tabela 3, $p < 0,05$). O DR9 e a estaterina revelaram efeito inibitório semelhante em todas as concentrações testadas ($p > 0,05$), mas estatisticamente diferente dos demais peptídeos em concentrações de 0,9 a 5,4 μM ($p < 0,05$). Somente nas concentrações de 7,2 e 9,0 μM , o DR9-RR14 demonstrou um efeito inibitório semelhante ao crescimento de cristais em comparação com DR9

e a estaterina. Como esperado, o RR14 e a histatina 3 mostraram um efeito inibitório insignificante para todas as concentrações testadas.

Tabela 3 - Efeito de peptídeos construídos derivados de estaterina e histatina 3 em diferentes concentrações sobre inibição de crescimento de cristais de hidroxiapatita (HA).

PEPTÍDEOS	0.9 μ M	1.8 μ M	2.7 μ M	3.6 μ M	5.4 μ M	7.2 μ M	9.0 μ M
DR9	1.78 \pm 0.16 ^b	1.56 \pm 0.21 ^b	0.85 \pm 0.05 ^b	0.80 \pm 0.07 ^b	0.63 \pm 0.06 ^b	0.53 \pm 0.08 ^b	0.24 \pm 0.03 ^b
DR9-DR9	1.09 \pm 0.07 ^a	0.68 \pm 0.07 ^a	0.54 \pm 0.04 ^a	0.50 \pm 0.07 ^a	0.43 \pm 0.05 ^a	0.28 \pm 0.06 ^a	0.12 \pm 0.01 ^a
RR14	2.04 \pm 0.11 ^b	2.00 \pm 0.03 ^c	1.97 \pm 0.07 ^d	2.00 \pm 0.05 ^d	1.99 \pm 0.06 ^d	1.99 \pm 0.06 ^c	2.01 \pm 0.07 ^c
DR9-RR14	1.98 \pm 0.01 ^b	1.79 \pm 0.07 ^c	1.64 \pm 0.09 ^c	1.20 \pm 0.02 ^c	0.94 \pm 0.09 ^c	0.59 \pm 0.17 ^b	0.23 \pm 0.05 ^b
Estaterina	1.67 \pm 0.18 ^b	1.45 \pm 0.11 ^b	0.72 \pm 0.06 ^b	0.69 \pm 0.10 ^b	0.54 \pm 0.06 ^b	0.52 \pm 0.04 ^b	0.34 \pm 0.07 ^b
Histatina 3	2.02 \pm 0.08 ^b	2.04 \pm 0.06 ^c	1.92 \pm 0.11 ^d	1.93 \pm 0.20 ^d	1.92 \pm 0.15 ^d	1.94 \pm 0.31 ^c	1.94 \pm 0.24 ^c

Os valores representam as médias e os desvios padrão dos cristais de cálcio de HA medidos a 560 nm usando um leitor de microplacas. Diferentes letras indicam diferença estatística, e os sobrescritos da mesma letra não indicam diferença estatística na mesma coluna ($p < 0,05$).

Quando os dados foram plotados com base na eficiência da concentração, a IC₅₀ foi calculada para todos os peptídeos e proteínas testados (Figura 1, Tabela 4). A histatina 3, proteína de controle negativo, e o RR14 não atingiram o valor IC₅₀. O DR9-RR14 atingiu o valor IC₅₀ a 3,80 μ M. Como esperado, DR9 e DR9-DR9 demonstraram um efeito inibitório significativo na atividade de crescimento de cristais, atingindo o valor IC₅₀ a 2,82 μ M e 1,07 μ M, respectivamente. A proteína de controle positivo, estaterina, atingiu o valor IC₅₀ a 2,50 μ M (tabela 4).

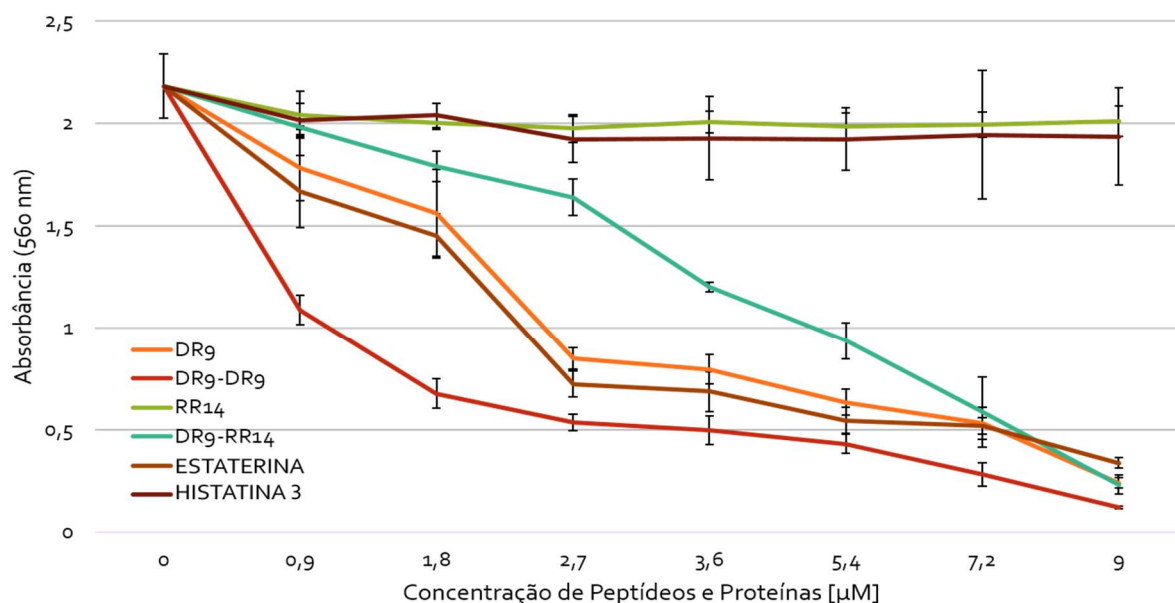


Figura 1 - Gráfico do efeito de inibição de peptídeos construídos derivados de estaterina e histatina 3 sobre o crescimento de cristais de hidroxiapatita. *Nota.* As barras representam o desvio padrão da média, calculada a partir de 3 experimentos independentes.

Tabela 4 - O valor IC_{50} de DR9, DR9-DR9, DR9-RR14 e estaterina. *Nota.* RR14 e histatina 3 não atingiram um IC_{50} , com base nas 7 concentrações testadas.

PROTEÍNA / PEPTÍDEO	IC_{50} (µM)	Varição IC_{50}
DR9-DR9	1.07	
DR9	2.82	2,64 (vezes)
RR14	não atingiu	
DR9-RR14	3.80	3,55 (vezes)
ESTATERINA	2.50	2,34 (vezes)
HISTATINA 3	não atingiu	

A solução de mistura de peptídeos DR9 e RR14 mostra resultados estaticamente similares na inibição de cristais de HA, quando comparados com DR9 em todas as sete concentrações. Notavelmente, os valores obtidos com as soluções de mistura de DR9 e RR14 foram significativamente mais ativos que o peptídeo híbrido DR9-RR14 nas concentrações de 0,9 a 7,2 µM. Somente na concentração de

9,0 μM , os peptídeos DR9-RR14 foram estaticamente iguais à solução de mistura de peptídeos DR9 e RR14 (Figura 2, $p > 0,05$).

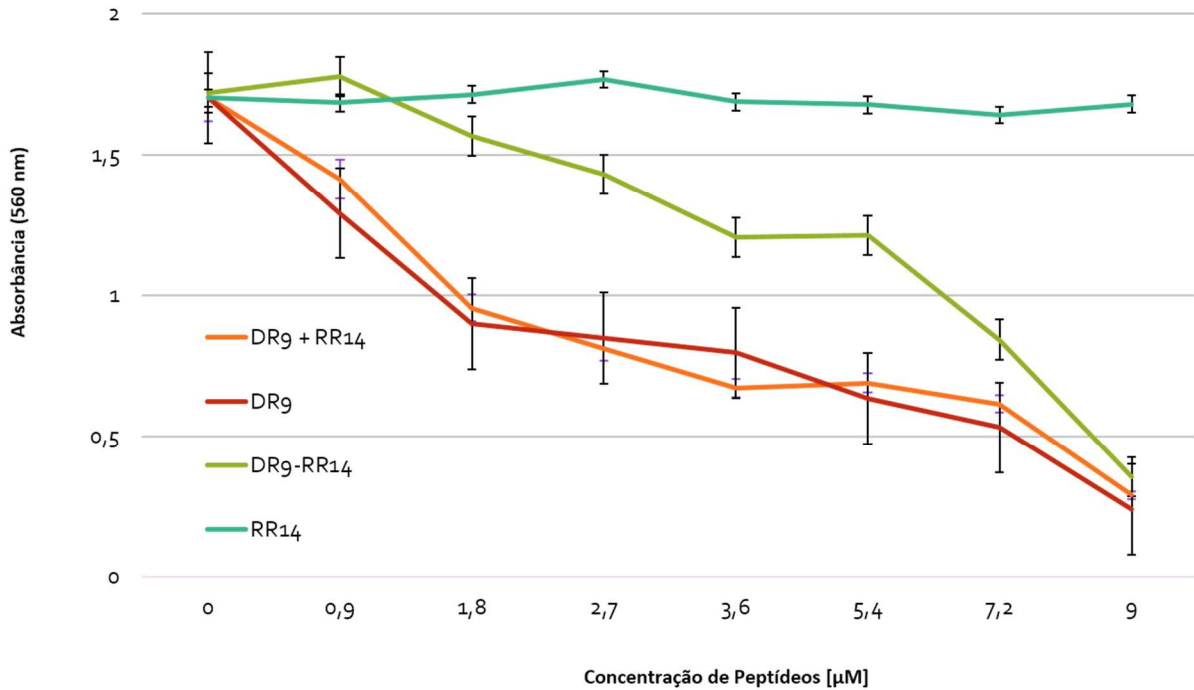


Figura 2 - Gráfico do efeito de inibição dos peptídeos DR9-RR14, DR9 e RR14 quando comparado com uma solução de mistura contendo DR9 e RR14 (DR9 + RR14). *Nota.* As barras representam o desvio padrão da média, calculada a partir de 3 experimentos independentes.

6 DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

A importância dos peptídeos salivares na homeostase bucal é cada vez mais evidente com pesquisas adicionais sobre peptídeos naturais (BECHINGER; GORR, 2016). No entanto, poucos estudos têm abordado os papéis funcionais dos peptídeos salivares recentemente identificados e seu potencial efeito biológico quando as modificações feitas com respeito ao ponto de vista terapêutico (VUKOSAVLJEVIC; CUSTODIO; SIQUEIRA, 2011). Os peptídeos apresentam potencial farmacêutico significativo em uma abordagem terapêutica ativa nas várias áreas médicas e biomédicas, como endocrinologia, urologia, obstetrícia, oncologia, etc. O foco é projetar moléculas de peptídeos naturais que possam manipular alvos biológicos relacionados à doenças para efeitos benéficos com baixa toxicidade. No entanto, os peptídeos que ocorrem naturalmente apresentam algumas limitações, como a duração inadequada da ação. Além disso, uma dose terapêutica eficaz não pode ser alcançada quando esses peptídeos são encontrados numa concentração fisiológica/patológica. Por outro lado, a identificação desses peptídeos que ocorrem naturalmente abre vias para o desenvolvimento de medicamentos à base de peptídeos, onde a via de evolução da proteína é explorada para eliminar os desafios relacionados à estabilidade do ambiente proteolítico adverso e à dose terapêutica.

Aqui, utilizou-se os peptídeos que ocorrem naturalmente na AEP para explorar as vias de evolução da proteína e seus efeitos sobre a inibição do crescimento de cristais de HA. Mais especificamente, replicado o domínio funcional de DR9 e fundidos os domínios funcionais de duas proteínas diferentes, estaterina e histatina 3.

Manipulou-se quimicamente o domínio de estaterina (DR9), que possui características biológicas significativas relacionadas à inibição do crescimento de cristais de HA que promove a remineralização do esmalte e inibe a formação de cálculos dentários (XIAO et al., 2015). Foi criada uma construção de duplicação, DR9-DR9. Além disso, uma construção híbrida, DR9-RR14, foi projetada a partir de domínios biológicos de estaterina e histatina 3. Para a avaliação da atividade de crescimento de cristais de HA destes peptídeos recém-construídos, optou-se por usar um ensaio em que a condição é mais representativa da situação *in vivo* que

esses peptídeos desafiarão na cavidade bucal (XIAO et al., 2015). Os resultados indicaram que DR9-DR9 foi significativamente mais ativo do que o peptídeo natural, DR9 e sua proteína nativa, estaterina. O peptídeo híbrido, DR9-RR14 demonstrou alguma habilidade de nível médio quando comparado com outros peptídeos e proteínas testadas. Esta observação é extremamente relevante uma vez que a principal ideia da criação do peptídeo híbrido é a de fundir funções biológicas de vários domínios peptídicos em um único peptídeo. Neste caso, levantou-se a hipótese de que a capacidade do DR9 e/ou da estaterina de inibir o crescimento de cristais de HA e RR14 e/ou histatina 3 na atividade antifúngica poderia ser fundida num único peptídeo, DR9-RR14. Com base nos valores de IC_{50} , observou-se que DR9-RR14 precisava de pelo menos 3,80 μ M, enquanto o DR9-DR9 precisava 1,08 μ M (quase quatro vezes menos) para alcançar o mesmo efeito. Por outro lado, o DR9-DR9 possui apenas uma única função biológica, enquanto o DR9-RR14 tem o potencial de reter funções multibiológicas. No entanto, o DR9-DR9 demonstrou a maior capacidade inibidora, atingindo a IC_{50} com uma concentração de 42,8% e 37,94% inferior à da estaterina e DR9, respectivamente. Pode-se especular que o fenômeno observado é baseado no pI desses peptídeos quando medido num valor de pH fisiológico salivar e o grau de fosforilação destes peptídeos. Por exemplo, o grau de fosforilação da osteopontina afeta seu potencial como inibidor (AZZOPARDI et al., 2010; GROHE et al., 2007). Estudos anteriores de fragmentos de estaterina (RAJ et al., 1992) mostraram que a mutação de ambas as fosfoserinas a uma serina simples, reduz a afinidade de ligação de HA por um fator de quase 9, indicando que os resíduos de fosfoserina e as cadeias laterais de aminoácidos ácidos são essenciais para a ligação de estaterina a HA. Em relação ao DR9, a presença de fosfoserina nas posições 2 e 3 mostrou o maior grau de inibição de HA quando comparada com os outros cinco peptídeos de estaterina não fosforilados, incluindo um peptídeo idêntico (DR9/2), faltando fosfato ligado covalentemente nas posições 2 e 3 (XIAO et al., 2015). Nesse estudo citado, temos um cenário em que o peptídeo não é apenas fosforilado em 2 e 3, mas também nas posições 11 e 12 com um pI inferior ao dos outros peptídeos testados. Esses achados indicam que a fosforilação, de fato, desempenha um fator crítico no mecanismo de crescimento de cristais de HA na cavidade bucal. No entanto, a base molecular deste fenômeno ainda precisa ser melhor elucidada.

Em relação à aplicação clínica bucal, existe uma clara necessidade de novas abordagens terapêuticas que possam contribuir para a homeostase bucal. O método mais eficiente para controlar a cárie e o cálculo dentário permanecem de natureza mecânica. Esses métodos são principalmente confinados às técnicas de escovação dentária e fio dental, que apenas são eficazes quando realizadas de forma adequada e diariamente. Os meios mecânicos de remoção da placa, no entanto, são difíceis de dominar consistentemente para um grande segmento da população. Exemplos são a parcela crescente dos idosos, bem como algumas pessoas com necessidades especiais.

Este estudo representa novas e promissoras metodologias moleculares para a exploração clínica na manutenção da saúde bucal. Mais especificamente, a visão de longo prazo está focada na geração de peptídeos para aplicações clínicas, uma vez que estes podem ser sintetizados quimicamente em larga escala e a custos de produção aceitáveis. É importante mencionar que o foco principal deste estudo não era gerar um novo fármaco, mas investigar a capacidade biológica de multiplicação de domínio e hibridação, o que foi demonstrado com sucesso. Reconhecemos que a interação entre esses peptídeos construídos e o ambiente bucal é extremamente complexa. Além disso, deve-se notar que vários outros testes adicionais, como a toxicidade e um modelo animal adequado, deveriam ser realizados antes de serem utilizados em ensaios clínicos.

7 CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

O DR9 demonstrou um significativo efeito inibitório na atividade de crescimento de cristais de cálcio e fosfato, quando comparado aos outros peptídeos testados. Em concentrações mais baixas, o DR9 mostrou função semelhante à estaterina. A partir do isolamento dos domínios funcionais das proteínas, estes foram duplicados e combinados, construindo assim o DR9-DR9 que teve sua função melhorada, significativamente mais ativo do que o peptídeo natural, DR9 e sua proteína nativa, estaterina.

Combinou-se também os peptídeos DR9 e RR14 que mostram resultados estatisticamente similares quando comparados com DR9 nas concentrações 7,2 e 9,0 μM . A criação deste peptídeo híbrido teve o intuito de fundir funções biológicas de vários domínios peptídicos em um único peptídeo, combinando a capacidade do DR9 ou da estaterina de inibir o crescimento de cristais de HA e do RR14 ou da histatina 3 na atividade antifúngica.

Combinações futuras podem conduzir ao desenvolvimento de uma nova estratégia, não tóxica e minimamente invasiva na prevenção de doenças. Este estudo representa novas e promissoras metodologias moleculares para a exploração clínica na manutenção da saúde bucal. Existe uma clara necessidade de novas abordagens terapêuticas que possam contribuir para a homeostase bucal.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

Azzopardi PV, O'Young J, Lajoie G, Karttunen M, Goldberg HA, Hunter GK. PLoS One [Internet]. 2010[cited 2017 June 07];5(2):e9330. Available from: <http://dx.doi.org/9310.1371/journal.pone.0009330>.

Bechinger B, Gorr, SU. Antimicrobial peptides. J Dent Res. 2017;96(3):254-60.

Bobek LA, Tsai H, Levine MJ. Expression of human salivary histatin and cystatin/histatin chimeric cDNAs in Escherichia coli. Crit Rev Bucal Biol Med. 1993;4(3-4):581-90.

Dawes C. Circadian rhythms in human salivary flow rate and composition. J Physiol. 1972;220(3):529-45.

Dawes C. What is the critical pH and why does a tooth dissolve in acid? J Can Dent Assoc. 2003;69(11):722-4.

Dawes C, Pedersen AM, Villa A, Ekström J, Proctor GB, Vissink A, et al. The functions of human saliva: a review sponsored by the World Workshop on Bucal Medicine VI. 2015;60(6):863-74.

Edgar WM. Saliva: its secretion, composition and functions. Br Dent J. 1992;172(8):305-12.

Gauci S, van Breukelen B, Lemeer SM, Krijgsveld J, Heck AJ. A versatile peptide pI calculator for phosphorylated and N-terminal acetylated peptides experimentally tested using peptide isoelectric focusing. Proteomics. 2008;8(23-24):4898-906.

Gilbert M, Shaw WJ, Long JR, Nelson K, Drobny GP, Giachelli CM, et al. Chimeric peptides of statherin and osteopontin that bind hydroxyapatite and mediate cell adhesion. J Biol Chem. 2000;275(21):16213-8.

Grohe B, Rogersd KA, Goldberga HA, Huntera GK. Crystallization kinetics of calcium oxalate hydrates studied by scanning confocal interference microscopy. J Cryst Growth. 2006;295(2):148-57.

Grohe B, O'Young J, Ionescu DA, Lajoie G, Rogers KA, Karttunen M, et al. Control of calcium oxalate crystal growth by face-specific adsorption of an osteopontin phosphopeptide. J Am Chem Soc. 2017;129(48):14946-51.

Grohe B, Taller A, Vincent PL, Tieu LD, Rogers KA, Heiss A, et al. Crystallization of calcium oxalates is controlled by molecular hydrophilicity and specific polyanion-crystal interactions. *Langmuir*. 2009;25(19):11635-46.

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

Hannig M, Hess NJ, Hoth-Hannig W, De Vrese M. Influence of salivary pellicle formation time on enamel demineralization: an in situ pilot study. *Clin Bucal Investig*. 2003;7(3):158-61.

Helmerhorst EJ. Whole saliva proteolysis: wealth of information for diagnostic exploitation. *Ann N Y Acad Sci*. 2007;1098:454-60.

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

Humphrey SP, Williamson RT. A review of saliva: normal composition, flow, and function. *J Prosthet Dent*. 2001;85(2):162-9.

Helmerhorst EJ, Alagl AS, Siqueira WL, Oppenheim FG. Bucal fluid proteolytic effects on histatin 5 structure and function. *Arch Bucal Biol*. 2006;51(12):1061-70.

Hodson NA, Linden RW. The effect of monosodium glutamate on parotid salivary flow in comparison to the response to representatives of the other four basic tastes. *Physiol Behav*. 2006;89(5):711-7.

Jin Y, Yip HK. Supragingival calculus: formation and control. *Crit Rev Bucal Biol Med*. 2002;13(5):426-41.

Margolis H C, Moreno EC. Kinetic and thermodynamic aspects of enamel demineralization. *Caries Res*. 1985;19(1):22-35.

McDonald EE, Goldberg HA, Tabbara N, Mendes FM, Siqueira WL. Histatin 1 resists proteolytic degradation when adsorbed to hydroxyapatite. *J Dent Res*. 2011;90(2):268-72.

Moreno EC, Zahradnik RT. Demineralization and remineralization of dental enamel. *J Dent Res*. 1979;58(Spec Issue B):896-903.

Nancollas GH, Johnsson MA. Calculus formation and inhibition. *Adv Dent Res.* 1994;8(2):307-11.

Nancollas GH, Mohan MS. The growth of hydroxyapatite crystals. *Arch Bucal Biol.* 1970;15(8):731-45.

Oppenheim FG, Helmerhorst EJ, Lendenmann U, Offner GD. Anti-candidal activity of genetically engineered histatin variants with multiple functional domains. *PLoS One*[Internet].2012[cited 2017 June 07];7(12):e51479. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0051479>.

Oppenheim FG, Salih E, Siqueira WL, Zhang W, Helmerhorst EJ. Salivary proteome and its genetic polymorphisms. *Ann N Y Acad Sci.* 2007;1098:22-50.

Raj PA, Johnsson M, Levine MJ, Nancollas GH. Salivary statherin: dependence on sequence, charge, hydrogen bonding potency, and helical conformation for adsorption to hydroxyapatite and inhibition of mineralization. *J Biol Chem.* 1992;267(9):5968-76.

Richardson CF, Johnsson M, Raj PA, Levine MJ, Nancollas GH. The influence of histatin-5 fragments on the mineralization of hydroxyapatite. *Arch Bucal Biol.* 1993;38(11):997-1002.

Schroeder HE. Formation and inhibition of dental calculus. Berne: Hans Huber; 1969.

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

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

Siqueira WL, Lee YH, Xiao Y, Held K, Wong W. Identification and characterization of histatin 1 salivary complexes by using mass spectrometry. *Proteomics.* 2012;12(22):3426-35.

Siqueira WL, Margolis HC, Helmerhorst EJ, Mendes FM, Oppenheim FG. Evidence of intact histatins in the in vivo acquired enamel pellicle. *J Dent Res.* 2010;89(6):626-30.

Tabak LA, Levine MJ, Jain NK, Bryan AR, Cohen RE, Monte LD, et al. Adsorption of human salivary mucins to hydroxyapatite. *Arch Bucal Biol.* 1985;30(5):423-7.

Thomadaki K, Helmerhorst EJ, Tian N, Sun X, Siqueira WL, Walt DR, Oppenheim FG. Whole-saliva proteolysis and its impact on salivary diagnostics. *J Dent Res.* 2011;90(11):1325-30.

Vukosavljevic D, Custodio W, Siqueira WL. Salivary proteins as predictors and controls for bucal health. *J Cell Commun Signal.* 2011;5(4):271-5.

Vukosavljevic D, Custodio W, Del Bel Cury AA, Siqueira WL. The effect of histatin 5, adsorbed on PMMA and hydroxyapatite, on *Candida albicans* colonization. *Yeast.* 2012;29(11):459-66.

Xiao Y, Karttunen M, Jalkanen J, Mussi MC, Liao Y, Grohe B, et al. Hydroxyapatite growth inhibition effect of pellicle statherin peptides. *J Dent Res.* 2015;94(8):1106-12.

Zimmerman JN, Custodio W, Hatibovic-Kofman S, Lee YH, Xiao Y, Siqueira WL. Proteome and peptidome of human acquired enamel pellicle on deciduous teeth. *Int J Mol Sci.* 2013;14(1):920-34.
