

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

Centro de Ciências da Saúde

Faculdade de Odontologia

**PELÍCULA ADQUIRIDA DO ESMALTE – A IMPORTÂNCIA DE SEUS
COMPONENTES PARA A PROTEÇÃO CONTRA A DESMINERALIZAÇÃO
DO ESMALTE DENTÁRIO**

CARLA MARTINS DE OLIVEIRA

Rio de Janeiro

2011

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

Centro de Ciências da Saúde

Faculdade de Odontologia

CARLA MARTINS DE OLIVEIRA

**PELÍCULA ADQUIRIDA DO ESMALTE – A IMPORTÂNCIA DE SEUS
COMPONENTES PARA A PROTEÇÃO CONTRA A DESMINERALIZAÇÃO
DO ESMALTE DENTÁRIO**

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia (Área de Concentração: Odontopediatria) da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Doutor em Odontologia (Área de Concentração: Odontopediatria).

Orientadores:

Profa. Dra. Gloria Fernanda Barbosa de Araújo Castro

Profa. Adjunta do Dep. de Odontopediatria e Ortodontia – FO/UFRJ

Prof. Dr. Walter Luiz Siqueira

Prof. Assistente de Odontologia e Bioquímica – UWO (Canadá)

Rio de Janeiro

2011

Oliveira, Carla Martins de

Película adquirida do esmalte – a importância de seus componentes para proteção contra a desmineralização do esmalte dentário / Carla Martins de Oliveira. - - Rio de Janeiro: UFRJ / Faculdade de Odontologia, 2011.

xxii, 77 f.: il.; 31cm

Orientadores: Gloria Fernanda Barbosa de Araújo Castro e Walter Luiz Siqueira

Tese (Doutorado) – UFRJ / Faculdade de Odontologia / Pós-graduação em Odontologia, 2011.

Referências bibliográficas: f. 51-53

1. Película adquirida do esmalte. 2. Cárie dental. 3. Proteína salivar. 4. Saliva. 5. Revisão sistemática. 6. Odontopediatria – Tese. I. Castro, Gloria Fernanda Barbosa de Araújo, II. Siqueira, Walter Luiz. III. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Odontologia, Pós-graduação em Odontologia. IV. Título.

DEDICATÓRIA

Dedico o trabalho desses últimos anos de minha vida
à minha mãe, Maria da Graça, e à
Romeu, Meu Amor

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À **Dra. Paula Mochidome Yamaguti**, pós-doutoranda da University of Western Ontario (UWO), Canadá, que foi um anjo que surgiu na minha vida no período em que vivi no Canadá. Sua amizade, carinho, atenção, disponibilidade, cuidado, ajuda e tantas outras coisas foram marcantes na minha vida. Não tenho como agradecer por tudo que fez por mim. Só quem viveu um inverno rigoroso sabe o valor da primavera.

“Todas as riquezas do mundo não valem um bom amigo.” (Voltaire)

À doutoranda **Claudia Yumi Kobaiashi** (UWO/USP), por seus ensinamentos e ajuda no laboratório. Mas, em especial, por sua amizade, apoio, estímulo e generosidade. Sua espontaneidade e alegria tornaram a caminhada um pouco mais fácil. Os momentos de descontração me fortaleciam para os momentos difíceis. Sem a sua presença, não há dúvidas de que determinados momentos teriam sido muito mais difíceis. Foi muito bom te conhecer. Sinto falta da sua companhia.

“Nenhum caminho é longo demais quando um amigo nos acompanha.”

À **Dra. Luz Adriana Castro**, voluntária no Salivary Research Lab (UWO), por sua ajuda durante o preparo das minhas amostras e, principalmente, por sua amizade, carinho, ajuda, preocupação e atenção. Nunca me esquecerei de você e sua família.

AGRADECIMENTOS

À **Deus** por ter cuidado de mim e das pessoas que amo, principalmente no período que estive longe. Agradeço por todas as coisas maravilhosas que me aconteceram e também pelas dificuldades, as quais me ajudaram a crescer com ser humano.

À **Nossa Senhora das Graças** por tantas graças recebidas em minha vida.

À minha mãe, **Maria da Graça**, um ser humano iluminado. Você é minha amiga, minha força e meu sustento. Agradeço por sua amizade, carinho, paciência, cuidado e orações, que me ajudaram a chegar ao “fim”. Agradeço à Deus por ter você em minha vida. Te amo!

Ao meu pai, **Antonio Carlos**, que sempre foi exemplo de honestidade, determinação e amor à Odontologia. Agradeço pelo amor, carinho e por entender e respeitar a escolha da *filhota* em seguir por este caminho, afastando-me da família, trabalho e país por um período para realizar um sonho.

Ao **Romeu Ricardo da Silva**, um dos maiores presentes que recebi de Deus. Seu amor, amizade, carinho, incentivo, compreensão e respeito pelo meu sonho foram fundamentais nessa caminhada. Seu exemplo de determinação foi meu estímulo nos momentos de dificuldade.

“Só pelo amor o homem se realiza plenamente.” (Platão)

Aos meus irmãos, **Rômulo** e **Bruno** pelo carinho e **Felipe** por ter contribuído para essa conquista.

À minha orientadora, **Profa. Dra. Gloria Fernanda Barbosa de Araújo Castro**, que aceitou encarar comigo esse desafio de estudar algo novo para nós duas. Obrigada por ter caminhado comigo nessa estrada. Sua orientação, apoio, incentivo e carinho foram marcantes nessa fase.

"Não se pode ensinar tudo a alguém, pode-se apenas ajudá-lo a encontrar por si mesmo."

(Galileu Galilei)

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Walter Luiz Siqueira**, pelo convite para ser sua primeira orientanda de doutorado e membro do laboratório que começava a formar na UWO, Canadá. Agradeço por ter confiado a mim a realização de um de seus principais estudos e pelo convite para continuar trabalhando com você. Não há dúvidas do quanto a experiência vivida no Canadá ajudou no meu crescimento pessoal.

"É fazendo que se aprende a fazer aquilo que se deve aprender a fazer." (Aristóteles)

À **Profa. Dra. Ivete Pomarico Ribeiro de Souza**, pela oportunidade de participar deste excelente Programa de Pós-Graduação que, há anos, tem me proporcionado crescimento profissional. Além disso, por colaborar para que eu realizasse o sonho de estudar em uma universidade no exterior.

"Toda a arte de ensinar é apenas a arte de acordar a curiosidade natural nas mentes jovens, com o propósito de serem satisfeitas mais tarde." (Anatole France)

Ao **Prof. Dr. Lincoln Nojima**, por sua disponibilidade, atenção e ajuda durante os processos burocráticos referentes à bolsa de Doutorado Sanduíche. Agradeço por todo incentivo e oportunidades.

À **Profa. Dra. Laura Salignac de Souza Guimarães Primo**, que me orientou durante o mestrado e continuou incentivando para fazer o doutorado. Agradeço pela confiança e carinho com que sempre me tratou.

À **Profa. Dra. Lucianne Cople Maia**, agradeço pela atenção, ensinamentos, incentivo e carinho durante esses anos.

À **Profa. Dra. Maristela Barbosa Portela**, por sua disponibilidade, ajuda, atenção e carinho.

Ao **Prof. Dr. Rogério Gleiser**, por seus ensinamentos e atenção desde a época da especialização e pelo carinho com que participou da banca de qualificação, fazendo importantes considerações.

Aos demais professores do Departamento de Odontopediatria da FO/UFRJ, **João Farinhas, Marcelo Castro, Bárbara, Nena, Fátima e Rosana** pelos ensinamentos e bom relacionamento durante todo esse tempo.

À **Profa. Dra. Renata Antoun Simão**, do Departamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais (COPPE/UFRJ), que me abriu as portas para conhecer, começar a estudar e trabalhar com AFM (Atomic Force Microscopy). Apesar da dificuldade para realizar o experimento, seus diversos compromissos e falta de tempo, sempre teve boa vontade em me orientar sobre a AFM. Sempre lembrarei disso com carinho.

Ao **Prof. Dr. Gilberto Weissmüller**, do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho (CCS/UFRJ), pelos ensinamentos e paciência durante as aulas da disciplina de AFM coordenada por ele.

Ao **Prof. Dr. Jeffrey L. Hutter**, do Dept. of Physics & Astronomy, da UWO, Canadá, agradeço muito por tamanha paciência, atenção, boa vontade, dedicação e profissionalismo durante os 11 meses que trabalhamos juntos no Laboratório de AFM. Por várias vezes, principalmente no início, tive vontade de chorar e me perguntei o que estava fazendo aprendendo AFM em inglês. Mas, graças à sua

ajuda, consegui prosseguir e progredir. Em breve, teremos uma boa publicação sobre esse estudo.

Aos doutorandos **Shailesh Nene e Stephen Hudson**, do Dept. of Physics & Astronomy, da UWO (Canadá) pela ajuda e paciência comigo enquanto estava fazendo experimento no Laboratório de AFM.

À mestranda **Nada Tabbara**, do Salivary Research Lab (UWO/Canadá), que me ajudou a dar os primeiros passos dentro de um laboratório de Bioquímica, me ensinando desde as coisas mais básicas às mais complexas. Agradeço muito pelos ensinamentos, paciência e boa vontade. Agradeço ainda por ter me ensinado também sobre o Canadá e ter proporcionado bons momentos de distração.

À técnica **Yizhi (Cindy) Xiao**, do Salivary Research Lab (UWO/Canadá), pela ajuda, ensinamentos e também pelo carinho e amizade.

Aos demais colegas do Salivary Research Lab (UWO/Canadá), **Erin McDonald, Jackie Hwang, Bogdan Zariczniak (Bob) e Rula Abdel al Kaade**, pela companhia e bom convívio que tivemos nesse período.

Aos **Profs. Drs. Stephen Sims, Bier e Amin Rizkalla** (UWO/Canadá), por terem disponibilizado equipamentos de seus laboratórios para que eu utilizasse em meus experimentos.

Ao **Prof. Dr. David Holdsworth** e ao técnico **Joseph Umoh**, do Pre-Clinical Imaging Research Centre, Robarts Institute (UWO/Canadá), pela colaboração nos experimentos com Micro-Tomografia Computadorizada.

Ao técnico **Tom Chrones** e a secretária **Stacey Madrigal**, da Schulich Medicine & Dentistry (UWO/Canadá) pela atenção, ajuda e carinho de sempre.

À **Craig Sarvis**, agradeço pelo carinho e atenção com que sempre me tratou, não medindo esforços para me ajudar.

Às colegas de turma de doutorado, **Ana Karla, Andréa Antonio e Viviane Pierro** pelo ótimo convívio durante todo esse período. E também aos colegas das outras turmas, **Márcia Alves, Roberta Barcelos, Luciana Pomarico, Patrícia Tanure, Viviane Cancio, Cristiana, Lívia, Rafael, Márcia, Valéria** e, em especial, **Tatiana Kelly**.

Às alunas de mestrado, em especial, as mestrandas **Renata Otero e Ticiania**, pelo carinho e companhia.

Às amigas desde a época de mestrado, **Rayen, Patrícia Risso e Senda**, que, de alguma forma, também participaram desse momento.

Às amigas, **Profas. Licínia Damasceno e Fátima Cristina Natal de Freitas**, pela amizade, carinho, mas principalmente, pela compreensão, incentivo e ajuda durante o período que estive fora do Brasil e “desfalquei” nossa equipe. Muito obrigada por tudo o que fizeram (e ainda fazem) por mim.

Ao **Prof. Dr. José Massao Miasato**, que mesmo sem trabalharmos mais juntos, continua me incentivando e apoiando.

À **Dra. Cristina Strufaldi**, por seu profissionalismo e amizade, ajudando-me e dando suporte para continuar minha caminhada.

Aos meus amigos de sempre, **Virgínia, Karla, Gláucia, Rômulo**, dentre outros, por terem entendido minha ausência, cansaço, estresse e mau-humor, muitas vezes.

À **D. Ayrce e Sr. Nestor**, pelo carinho e incentivo de sempre.

À coordenação da FO/Unifeso, da ABO - Duque de Caxias e à Profa. **Claudia Marassi**, por terem entendido e aceitado que eu me ausentasse das atividades acadêmicas durante o período do Doutorado Sanduíche.

Aos **meus alunos** pelo carinho, compreensão e incentivo. Em especial, a **Waldir Junior**, por sua amizade.

Aos funcionários do Departamento de Odontopediatria da FO/UFRJ **Kátia, Gina, Robson, Zezé, Luíza, Rose, Isabel, Edinaldo, Sr Jorge, Neide, Mere e Andréa**, pelo convívio harmonioso e alegre. Principalmente, ao **João Carlos Monteiro**, que sempre está disposto a ajudar com alegria. Você é uma pessoa muito especial!

À **CAPES** e **FAPERJ** pelo apoio financeiro durante o curso de Doutorado. Em especial, à **CAPES**, pela bolsa de estudo PDEE (Programa de Doutorado com Estágio no Exterior), que possibilitou que eu estudasse na University of Western Ontario (Canadá).

Que nunca desperte em mim a consciência de que minha educação está completa, mas sim, que eu tenha força e disponibilidade para continuamente buscar aumentar meu conhecimento.

Moses Maimonides

RESUMO

OLIVEIRA, Carla Martins de. **Película adquirida do esmalte – a importância de seus componentes para a proteção contra a desmineralização do esmalte dentário**, 2011. Tese (Doutorado em Odontologia, área de concentração em Odontopediatria) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

O presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito protetor da película adquirida do esmalte (PAE), formada por diferentes componentes, contra a desmineralização *in vitro* do esmalte dentário. Na primeira etapa, uma revisão sistemática da literatura buscou evidências sobre a relação entre proteínas salivares e a doença cárie. Foram selecionados estudos observacionais controlados comparando a presença e/ou concentração de proteínas salivares entre indivíduos cárie-resistentes (CPO=0) e cárie-susceptíveis (CPO>0). A busca eletrônica pelos estudos foi feita nas bases de dados PubMed, Ovid Medline, ISI Web of Science, Medline, Cochrane, Lilacs, Scielo, BBO, Paho e Wholis, usando os descritores “dental caries” OU “tooth demineralization” OU “dental caries susceptibility” OU “dental enamel solubility” E “salivary proteins and peptides” OU “saliva” E “proteins”. De 188 estudos identificados, somente nove foram incluídos na revisão sistemática e cinco apresentaram evidência de relação entre proteínas salivares e cárie dental. Contudo, apesar de alta evidência encontrada, mais estudos com metodologia bem definida são necessários para que se possa identificar proteínas salivares como biomarcadores para a doença cárie. Na segunda etapa, um estudo *in vitro* avaliou o efeito protetor da PAE, formada por diferentes amostras salivares, contra a desmineralização do esmalte. Espécimes dentários foram expostos, por duas horas, à saliva total (ST), saliva da parótida (SP), ST dializada e SP dializada, permitindo a adsorção de proteínas sobre o esmalte dentário e, conseqüentemente, a formação de PAE. A diálise das amostras salivares foi realizada com membrana de peso molecular de corte igual a 1 kDa, o que permitiu a remoção de íons, principalmente, o cálcio e fosfato, das amostras salivares. Para o grupo controle foi empregada água deionizada (sem a presença de íons ou proteínas), não havendo assim a formação de PAE sobre os espécimes dentários deste grupo. Então os espécimes foram expostos a solução desmineralizadora (pH 4,5) por 12 dias. A concentração de cálcio e fosfato perdidos do espécime dentário para a solução durante o processo de desmineralização foi medida a fim de determinar a perda mineral e, conseqüentemente, o potencial de proteção contra a desmineralização. Através dos resultados obtidos constatou-se que, os grupos onde os espécimes dentários foram cobertos por PAE apresentaram maior efeito protetor contra a desmineralização do que o grupo controle ($p < 0,05$). Entretanto, quando a PAE foi formada na ausência de íons cálcio e fosfato na saliva, o efeito protetor contra desmineralização foi menor do que a PAE formada por saliva não dializada ($p < 0,05$). Isso confirma a importância da PAE para proteção contra desmineralização, porém, essa proteção pode ser influenciada pela composição da PAE.

DESCRITORES: cárie dental, proteínas salivares, película adquirida do esmalte, saliva, revisão sistemática.

ABSTRACT

OLIVEIRA, Carla Martins de. **Película adquirida do esmalte – a importância de seus componentes para a proteção contra a desmineralização do esmalte dentário**, 2011. Tese (Doutorado em Odontologia, área de concentração em Odontopediatria) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

The present study aimed to evaluate the protective effect of acquired enamel pellicle (AEP) formed by different components against the *in vitro* dental enamel demineralization. At the first stage, a systematic review of literature searched for evidences about the relation between salivary proteins and dental caries. Controlled observational studies comparing the presence and concentration of salivary proteins between caries-resistant (DMF=0) and caries-susceptible (DMF>0) subjects were selected. Electronic search was performed in the PubMed, Ovid Medline, ISI Web of Science, Medline, Cochrane, Lilacs, Scielo, BBO, Paho and Wholis databases applying the keywords “dental caries” OR “tooth demineralization” OR “dental caries susceptibility” OR “dental enamel solubility” AND “salivary proteins and peptides” OR “saliva” AND “proteins”. From 188 identified studies, only nine were included in the systematic review and five presented evidence of relation between salivary proteins and dental caries. However, although a high evidence was found, more studies with a well defined methodology are necessary to identify salivary proteins as biomarkers for caries disease. At the second stage, an *in vitro* study evaluated the protective effect of AEP formed by different saliva samples against enamel demineralization. Dental specimens were exposed, for two hours, to whole saliva (WS), parotid saliva (PS), dialyzed WS and dialyzed PS, allowing the adsorption of proteins on the enamel surface and, consequently, the formation of AEP. The saliva samples dialysis was performed by a membrane with 1 kDa MWCO for the removal of salivary ions, specially, calcium and phosphate. For the control group it was applied deionized water (without the presence of ions and proteins) so, no AEP was formed on dental specimens from this group. Then, the specimens were exposed to demineralizing solution (pH 4.5) for 12 days. The concentration of calcium and phosphate released from dental specimen to the solution during demineralization process was measured to determine the mineral loss and, consequently, the protective potential against demineralization. Based on the obtained results, it was observed that groups which dental specimens were coated by AEP showed a higher protective effect against demineralization than the control group ($p < 0.05$). Nevertheless, when the AEP was formed without calcium and phosphate ions in saliva, the protection against demineralization was lower than the AEP formed by undialyzed saliva ($p < 0.05$). This result confirms the importance of AEP for the protection against demineralization, however, this protection can be influenced by AEP composition.

KEYWORDS: Dental caries, salivary proteins, acquired enamel pellicle, saliva, systematic review.

RESUMEN

OLIVEIRA, Carla Martins de. **Película adquirida do esmalte – a importância de seus componentes para a proteção contra a desmineralização do esmalte dentário**, 2011. Tese (Doutorado em Odontologia, área de concentração em Odontopediatria) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

Este estudio tuvo como objetivo evaluar el efecto protector de la película adquirida salival (PAS), formado por diferentes componentes, contra la desmineralización del esmalte dental *in vitro*. En la primera etapa, una revisión sistemática de la literatura buscó evidencia sobre la relación entre las proteínas salivales y caries dental. Se seleccionaron los estudios observacionales controlados comparando la presencia y concentración de proteínas en la saliva de individuos resistentes a la caries (CPO-D = 0) y susceptibles de caries (CPOD > 0). La búsqueda electrónica de estudios se realizó en el PubMed, Ovid MEDLINE, ISI Web of Science, Medline, Cochrane, LILACS, SciELO, BBO, Paho y WHOLIS utilizando las palabras clave "la caries dental" O "diente desmineralización" O "dentales susceptibilidad a la caries" O "solubilidad del esmalte dental" y " las proteínas salivales y péptidos" O "saliva" y "proteínas". De los 188 estudios identificados, sólo nueve fueron incluidos en la revisión sistemática y cinco mostraron evidencia de una relación entre las proteínas salivales y caries dental. Sin embargo, a pesar de la alta evidencia encontrada, nuevos estudios con metodología bien definida son necesarios para poder identificar las proteínas salivales como biomarcadores de la caries dental. En el segundo paso, un estudio *in vitro* se evaluó el efecto protector de la PAS, formado por diferentes muestras de saliva contra la desmineralización del esmalte. Muestras dentales se expusieron durante dos horas, el total de la saliva (TS), la saliva parótida (SP) y SP dializados y ST dializados, lo que permite la adsorción de proteínas en el esmalte de los dientes y, en consecuencia, la formación de PAS. La diálisis de muestras de saliva se realizara con membrana de corte de pesos moleculares igual a 1 kDa, lo que permitió la eliminación de los iones, principalmente calcio y fosfato. Para el grupo control se utilizó agua desionizada (sin la presencia de iones y proteínas), y por lo tanto no hay formación de especímenes PAS de este grupo. Los especímenes fueron expuestos a la solución de desmineralización (pH 4,5) durante 12 días. La concentración de calcio y fosfato perdido durante el proceso de desmineralización se mide para determinar la pérdida de minerales y por lo tanto el potencial de protección contra la desmineralización. A través de los resultados se encontró que los grupos en que los especímenes han sido cubiertos por PAS mostró mayor efecto protector contra la desmineralización que el grupo de control ($p < 0,05$). Sin embargo, cuando PAS se formó en la ausencia de iones de calcio y fosfato en la saliva, el efecto protector contra la desmineralización fue menor que el formado por PAS no saliva dializados ($p < 0,05$). Esto confirma la importancia de PAS para la protección contra la desmineralización, pero esta protección puede verse influida por la composición de los PAS.

PALABRAS CLAVES: Caries dental, proteínas salivales, película adquirida salival, saliva, revisión sistemática.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

ARTIGO 1

Chart 1: Quality assessment (criteria to evaluate the risk of bias of selected studies).....	22
Figure 1: Stages of the studies selection process.....	23

ARTIGO 2

Figure 1: Schematic figure of the study design.....	40
Figure 2: SDS-PAGE gel of saliva samples and densitometry of protein bands.....	41
Graphic 1: Calcium concentration released from enamel specimens during demineralization process.....	41
Graphic 2: Phosphate concentration released from enamel specimens during demineralization process.....	42

APÊNDICE

Figura 1: Imagem de micro-tomografia computadorizada de amostra dentária encubada com saliva total antes (a) e após o processo de desmineralização (b)....	55
Figura 2: Figura esquemática do desenho de estudo.....	55

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

Table 1: Description of the selected studies..... 24

ARTIGO 2

Table 1: Calcium, phosphate and total protein concentrations of saliva samples before and after dialysis procedure..... 40

LISTA DE ABREVIATURAS

AEP	Acquired Enamel Pellicle
AFM	Atomic Force Microscopy
Arg	Arginine/arginina
ANOVA	Analysis of Variance
BCA	Bicinchoninic Acid
BBO	Bibliografia Brasileira de Odontologia
C	Celsius
ceo	Cariado, extraído ou extração indicada, obturado
CaCl ²	Calcium chloride / cloreto de cálcio
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
cm ²	Square centimeter
CPO-D	Cariados, Perdidos, Obturados – Dentes
CPO-S	Cariadas, Perdidas, Obturadas – Superfícies
Da	Daltons
Db	Double band
dL	Deciliters
dmf	Decay, Missing, Filled Index (for deciduos)
dmf-s	Decay, Missing, Filled – surfaces (for deciduos)
dmf-t	Decay, Missing, Filled – tooth (for deciduos)
DMF	Decay, Missing, Filled Index (for permanents)
DMF-S	Decay, Missing, Filled – surfaces (for permanents)
DMF-T	Decay, Missing, Filled – tooth (for permanents)
g	Gravitation
IgA	Imunoglobulin A

IgG	Imunoglobulin G
IgM	Imunoglobulin M
kDa	kiloDaltons
Lilacs	Latin American and Caribbean Health Science
lys	lysine - lisina
M	Molar
MeSH	Medical Subject Heading
mg/L	Miligrams/liters
mL	Mililiters / mililitros
min	Minutes
mm	Milimeters
mm ³	Cubic milimeters
mM	Milimolar
Micro-CT	Micro-computed tomography
MW	Molecular Weight
MWCOs	Molecular Weight Cut-Offs
nm	nanometers
NaH ₂ PO ₄	Monosodium phosphate / fosfato monossódico
O.D.	Oxygen Demand
Paho	Pan American Health Organization
PAS	Película Adquirida Salival
PRP	Proline-rich proteins / proteínas ricas em prolina
pH	Potential Hydrogen / Potencial hidrogênico
Pa	Parotid acidic
PAE	Película adquirida do esmalte
Pb	Parotid basic

pl	Isoelectric point
Pm	Parotid middle band
Pr	Proline-rich
Ps	Parotid size variant
PS	Parotid Saliva
SciELO	Scientific Electronic Library Online
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis
SP	Saliva de parótida
SPS	Stimulated Parotid Saliva
ST	Saliva total
STROBE	Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology
SWS	Stimulated Whole Saliva
UV	Ultra-violet
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
USA	United States of America
UWS	Unstimulated Whole Saliva
UWO	University of Western Ontario
V	Voltagem
v/v	Volume/volume
WS	Whole Saliva
Wholis	World Health Organization's Library
yr / yrs	year / years
µg	Micro grams
µL	Micro Liters
µg/L	Micro grams/Liters

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Por cento
μ	Micro
>	Maior que
\geq	Maior ou igual
<	Menor que
=	Igual
$^{\circ}$	Grau/degree
χ^2	Chi-square
#	Número
\sim	Aproximadamente

ÍNDICE

1	Introdução	1
2	Proposição	5
2.1	Objetivo Geral.....	5
2.2	Objetivos Específicos	5
2.2.1	PRIMEIRO ESTUDO	5
2.2.2	SEGUNDO ESTUDO	5
3	Delineamento da Pesquisa	6
4	Desenvolvimento da Pesquisa.....	9
4.1	Artigo 1	10
4.2	Artigo 2	25
5	Discussão	43
6	Conclusões	50
7	Referências Bibliográficas.....	51
	Anexos	54
	Apêndice	55

1 INTRODUÇÃO

A película adquirida do esmalte (PAE) consiste em um filme orgânico formado sobre a superfície dentária através da adsorção seletiva de macromoléculas presentes na saliva. Tal estrutura é formada apenas após a erupção dentária, não apresentando assim origem embriológica, como no caso da cutícula primária de esmalte (DAWES et al., 1963).

A formação da PAE é muito rápida, começando imediatamente após a exposição da superfície dentária à saliva (VASSILAKOS et al., 1993; VACCA-SMITH & BOWEN, 2000). A adsorção seletiva de proteínas salivares sobre a superfície dentária é comprovada por vários estudos (HAY, 1969; YAO et al., 2003), sendo as *proteínas precursoras de película* as primeiras proteínas salivares a serem adsorvidas sobre a superfície do esmalte dentário. Este fato é explicado pela alta afinidade que tais proteínas (histatina, estaterina e PRP - Proteínas Ricas em Prolina) têm pela hidroxiapatita (HAY, 1973), o que faz com que sejam capazes de reagir com os íons fosfato do esmalte, permitindo que a formação da PAE sobre a superfície sólida seja muito rápida, ocorrendo imediatamente após a exposição à saliva (VASSILAKOS et al., 1993). Além disso, a presença de fosfoproteínas (proteínas que apresentam grupo fosfato em sua composição), como a histatina 1 e a estaterina, é coincidente com a interação iônica entre as proteínas salivares e a superfície do esmalte (YAO et al., 2003).

A PAE é claramente distinta do biofilme dental (HANNIG & JOINER, 2006), uma vez que é livre de bactérias (DAWES et al., 1963). No entanto, atua como base

para subsequente adesão de microorganismos, os quais sob certas condições podem desenvolver o biofilme dental (TENOVU & LAGERLÖF, 1994). Estudos *in vitro* mostraram que sua espessura varia de acordo com o arco dental e superfície dentária, sendo mais fina na face palatina de dentes ântero-superiores (0,3 μm) e mais espessa na face lingual de dentes postero-inferiores (1,6 μm) (AMAECHI et al., 1999). No arco inferior, quando comparada a espessura da PAE em relação as superfícies vestibular e lingual, esta apresenta-se significativamente mais espessa na superfície lingual, tanto de dentes anteriores quanto posteriores, numa proporção de 2:1. No entanto, no arco superior, a superfície palatina de dentes anteriores é significativamente menos espessa do que a vestibular. O mesmo acontece em relação aos dentes posteriores (HANNIG et al., 1999).

A diferença na espessura da PAE de acordo com o arco dental e superfície dentária é justificada por alguns fatores. Primeiramente, o dorso da lingual é queratinizado e, conseqüentemente, mais abrasivo do que seu ventre. Desta forma, o dorso da língua pode limitar a espessura da PAE na face palatina dos dentes superiores e ser parcialmente responsável por uma película menos espessa nessa região. Tal fato não ocorre no arco inferior. Além disso, a presença de PAE mais espessa na face lingual de dentes inferiores pode ser porque esta região é constantemente irrigada por saliva proveniente das glândulas submandibular e sublingual, as quais secretam, por exemplo, a mucina, que é uma das proteínas salivares que compõem a PAE (AMAECHI et al., 1999; HANNIG et al., 1999).

Devido ao seu contato íntimo com a superfície dentária, a PAE é valiosa para a manutenção da integridade do dente (HANNIG & JOINER, 2006; SIQUEIRA et al., 2007a), sendo considerada de grande importância e interesse biológico e clínico (ARMSTRONG, 1968). Dentre suas funções, a PAE promove lubrificação da

estrutura dentária protegendo-a do contato com dentes antagonistas, tecidos moles e alimentos abrasivos (TABAK et al., 1982), atua em relação a adesão bacteriana (HANNIG & JOINER, 2006), reduz o desgaste do esmalte e dentina decorrente de abrasão por dentifrícios (JOINER et al., 2008) e protege contra a erosão dental (ZHRADNIK et al., 1976; AMAECHI et al., 1999; HANNIG et al., 2003).

Em relação a essa última função, foi observado que, mesmo quando formada em curto período de tempo, a PAE apresenta efeito protetor contra erosão dental (AMAECHI et al., 1999; HANNIG et al., 2003; HANNIG et al., 2004), não havendo diferença significativa entre a PAE formada em 2, 6, 12, 24 horas ou 7 dias (HANNIG et al., 1999; HANNIG & BALZ, 2001; HANNIG et al., 2003). Foi demonstrado ainda que, a PAE formada em três minutos é capaz de reduzir significativamente a influência erosiva do ácido cítrico sobre a superfície dentária (HANNIG et al., 2004). Contudo, o local e a gravidade da lesão causada por erosão podem ser determinados pela variação da espessura da PAE entre os arcos dentários (AMAECHI et al., 1999).

Além do que já foi apresentado, a PAE também desempenha um papel importante no controle da desmineralização do esmalte dentário. Por sua função de permeabilidade seletiva, ela regula o processo de desmineralização/remineralização da superfície dentária (ZHRADNIK et al., 1976; ZHRADNIK et al., 1977, 1978; HAY et al., 1982) atuando como barreira e mantendo assim a integridade da superfície do esmalte dentário através da prevenção da desmineralização e facilitação da remineralização (HANNIG & JOINER, 2006). Isso ocorre porque a PAE é capaz de modificar a difusão de ácidos e transportar íons cálcio e fosfato tanto para o interior quanto para o exterior da superfície do esmalte (ZHRADNIK et al., 1976; ZHRADNIK et al., 1977, 1978; HAY et al., 1982; SLOMINANY et al.,

1986). No entanto, o mecanismo preciso que regula a difusão dos íons entre a superfície do esmalte e o ambiente bucal na presença de PAE ainda não é completamente compreendido (HANNIG & JOINER, 2006).

Desta forma, o conhecimento sobre a formação, a composição e a função da PAE poderá esclarecer o processo de adsorção de proteínas salivares sobre a superfície dentária, bem como os processos de desmineralização/remineralização, de aderência bacteriana e de atividade antimicrobiana. Limitações devido a pequena quantidade de material capaz de ser coletado da superfície dentária retardaram o avanço nas pesquisas sobre esse tema. Entretanto, com o desenvolvimento de técnicas proteômicas sensíveis nos últimos anos, foi possível a caracterização de material orgânico como proteínas e peptídeos na PAE (SIQUEIRA et al., 2007b). Tais técnicas permitiram, por exemplo, a identificação de 130 proteínas (SIQUEIRA et al., 2007a) e 78 peptídeos (SIQUEIRA et al., 2009) diferentes na PAE *in vivo*.

Sendo assim, considerando que uma das principais funções da PAE consiste na proteção contra desmineralização do esmalte dentário, é de grande relevância estudar o papel de seus componentes neste processo. Uma vez comprovada a influência de algum de seus componentes como agente protetor, pode-se sugerir seu emprego em produtos bucais, tais como, dentifrícios, soluções para bochecho ou saliva artificial, a fim de prevenir a desmineralização e/ou favorecer a remineralização do esmalte dentário.

2 PROPOSIÇÃO

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito protetor da película adquirida do esmalte formada por diferentes componentes contra a desmineralização *in vitro* do esmalte dentário.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1 PRIMEIRO ESTUDO

- ✓ Avaliar, através da realização de revisão sistemática da literatura, se há evidências científicas da relação entre proteínas salivares e a doença cárie, de forma que essas proteínas possam ser indicadas como biomarcadores para a doença.

2.2.2 SEGUNDO ESTUDO

- ✓ Avaliar o efeito protetor da película adquirida do esmalte formada por amostras salivares com e sem a presença de íons (em especial, cálcio e fosfato) sobre a desmineralização *in vitro* do esmalte dentário.

3 DELINEAMENTO DA PESQUISA

A presente pesquisa foi dividida em dois estudos. O primeiro consistiu em uma revisão sistemática da literatura a fim de avaliar as evidências científicas sobre a relação entre proteínas salivares e a doença cárie em sujeitos clinicamente saudáveis. Para isso, foram realizadas buscas eletrônicas nas bases de dados PubMed, Ovid Medline, ISI Web of Science, Medline, Cochrane, Lilacs, Scielo, BBO, Paho e Wholis, usando os descritores “dental caries” e “salivary proteins”, e seus respectivos sinônimos em português e espanhol, quando necessário. Foram selecionados estudos observacionais controlados que compararam a presença e/ou quantidade de proteínas salivares entre indivíduos considerados cárie-resistentes (CPO ou ceo=0) e cárie-susceptíveis (CPO ou ceo>0).

O segundo estudo foi realizado no Salivary Research Laboratory, Schulich School of Medicine and Dentistry, da University of Western Ontario (Canadá) e foi aprovado pelo Institutional Review Board of The University of Western Ontario (no. 16181E) (Anexo 1, página 54). Neste estudo *in vitro* foi avaliado o efeito protetor da PAE de diferentes composições contra a desmineralização do esmalte dentário. Para este fim, saliva total, saliva total dializada, saliva de parótida e saliva de parótida dializada foram empregadas para possibilitar a formação *in vitro* de PAE com diferente composição. O procedimento de diálise foi realizado com membrana de diálise com peso molecular de exclusão igual a 1 kDa, o que permitiu a remoção de íons, principalmente cálcio e fosfato, da amostra salivar. Para o grupo controle foi empregado água deionizada (sem a presença de íons ou proteínas). Desta forma, o estudo foi composto por cinco grupos.

Para confirmar a remoção de cálcio e fosfato das amostras salivares dializadas, foi realizada a análise da concentração destes íons nas amostras salivares antes e após o procedimento de diálise, como apresentada na tabela 1 (pág. 40) do segundo estudo. A fim de certificar se houve perda de proteínas salivares decorrente do procedimento de diálise, foi realizado um gel SDS-PAGE das amostras salivares antes e após a diálise, onde foi analisada a densidade das bandas de três proteínas com diferentes pesos moleculares.

Molares permanentes hígidos, sem defeito de esmalte, fratura ou mancha branca, foram seccionados a fim de se obter amostras dentárias com espessura entre 150-160 μm . As amostras dentárias foram então recobertas por esmalte resistente a ácido, sendo deixada uma “janela” de 2 mm na superfície do esmalte dentário. Feito isso, as amostras dentárias foram encubadas por duas horas com amostras salivares a fim de que fosse formada, *in vitro*, PAE na janela deixada na superfície do esmalte. No caso do grupo controle, como foi utilizada água deionizada, não houve formação de PAE. Temperatura controlada de 37° C e leve movimentação das amostras durante esse período permitiram simular o ambiente bucal.

Após a formação *in vitro* da PAE, as amostras dentárias foram encubadas em solução desmineralizadora (2,2 mM CaCl_2 ; 2,2 mM NaH_2PO_4 ; 0,05 M ácido acético; pH 4,5) objetivando formar lesão por desmineralização no esmalte dentário, semelhantes as ocorridas em lesões por cárie. Como durante o processo de desmineralização a superfície de esmalte perde cálcio e fosfato para o meio (neste caso representado pela solução desmineralizadora em si), a análise da concentração de cálcio e fosfato presentes nesta solução após o processo demonstrará o quanto houve de perda mineral. Ao realizar comparação entre os

grupos, o grupo que apresentar maior proteção contra desmineralização será aquele que terá permitido menor perda de cálcio e fosfato e, conseqüentemente, menor concentração destes íons na solução desmineralizadora. Para análise estatística dos dados obtidos, foram realizados os testes de Tukeys e ANOVA, com nível de significância igual a 5%.

4 DESENVOLVIMENTO DA PESQUISA

4.1 ARTIGO 1: Salivary proteins as biomarker for dental caries – A systematic review

4.2 ARTIGO 2: Effect of dialyzed saliva on the human enamel demineralization

4.1 ARTIGO 1

Salivary proteins as biomarker for dental caries

Running title: Salivary proteins and dental caries

Carla Martins¹, Ana Karla Buczynski¹, Walter Luiz Siqueira², Lucianne Cople Maia¹,
Gloria Fernanda Barbora Araújo Castro¹

¹ Department of Pediatric Dentistry and Orthodontics, School of Dentistry, Federal University of Rio de Janeiro, Brazil.

² Department of Biochemistry, Schulich Medicine and Dentistry, University of Western Ontario, Canada.

Abstract

Objective: To develop a systematic review about the relation between salivary proteins and dental caries by comparing caries-resistant and caries-susceptible subjects and evaluate the possibility of salivary proteins to be considered as biomarker for dental caries. *Methods:* Electronic search was performed in the PubMed Medline, Ovid Medline, ISI Web of Science, Medline, Cochrane Library, Lilacs, Scielo, BBO, Paho and Wholis databases applying the following MeSH terms: “dental caries” OR “tooth demineralization” OR “dental caries susceptibility” OR “dental enamel solubility” AND “salivary proteins and peptides” OR “saliva” AND “proteins”. To be eligible for the systematic review, observational controlled studies should be composed by groups with caries-resistant and caries-susceptible subjects. Studies with high risk of bias were excluded. *Results:* From a total of 188 identified studies, only nine were included in this systematic review. Six studies were classified as “low risk of bias” and three as “moderate risk of bias”. Five studies observed relation between salivary proteins and dental caries. *Conclusion:* There are high evidences of the relation between salivary proteins concentration and dental caries experience, however, more investigations must be developed to establish salivary proteins as biomarker for dental caries.

Key words: dental caries, salivary proteins, saliva, systematic review

Introduction

Dental caries is the most common infectious oral disease in human beings¹ and represents a serious stomatological problem in many countries². As a multifactorial disease, there is no doubt about the bacterial cause of caries lesions. However, additional factors or indicators have demonstrated an influence on acceleration or slowing down of the development of new caries lesions. So, many researchers have been inspired to study caries-inducing factors, and also, defense mechanisms against dental caries².

As saliva directly surrounds oral soft and hard tissues and contains the elements required for host protection, it is expected to be an useful biomarker for oral diagnostics³. Proteomic analysis has been successfully employed to identify potential salivary biomarkers for the diagnostic of many diseases⁴. Regarding to dental caries, the identification of salivary proteins as biomarker would allow, for example, the insertion of caries-susceptible subjects in oral health promotion program to control diet and hygienic habits in order to avoid dental caries development. On the other hand, in case of salivary proteins be related to oral health, or enamel remineralization, they can be employed for prevention by developing assays to use salivary proteins in dental office or products for oral hygiene.

However, studies about salivary proteins and dental caries have presented conflicting results. Thus, considering the Evidence Based Dentistry, the present study aimed to develop a systematic review about the relation between salivary proteins and dental caries by comparing caries-resistant and caries-susceptible

subjects. In this way, we can evaluate the possibility of salivary proteins to be considered as a biomarker for dental caries.

Material and Methods

This systematic review included controlled observational studies that evaluated the relation between salivary proteins and dental caries by comparing caries-resistant (DMF or dfm=0) and caries-susceptible (DMF or dfm >0) subjects.

Search strategy

Electronic search was performed in the PubMed Medline, Ovid Medline, ISI Web of Science and Medline databases applying the following combinations of MeSH (Medical Subject Heading) terms: “dental caries” OR “tooth demineralization” OR “dental caries susceptibility” OR “dental enamel solubility” AND “salivary proteins and peptides” OR “saliva” AND “proteins”. The same search strategy was used in Lilacs, Scielo, BBO, Paho and Wholis Databases, except for the synonymous words in Portuguese and Spanish, which were added to the research. Additionally, the Cochrane Library was searched for systematic reviews about “dental caries” and “salivary proteins”. The database search was performed by two reviewers (CM and AKB) who included studies published between 1950 and October, 2010. All searches were limited to “humans”. Besides, hand search of the references and “related articles” link search from the selected papers were performed.

Both reviewers checked, independently, the title and abstract of each one of the identified studies. Those studies which were considered obviously not relevant were discarded from this research. Then, the full text of each remaining study was

read. The relevant studies were retained and those which fulfilled the inclusion criteria were selected for this systematic review.

Study selection criteria

Controlled observational studies which sample was composed by a group of caries-resistant subjects (DMF or dmf=0) and another group of caries-susceptible subjects (DMF or dmf>0) were initially selected. Only studies with healthy individuals who were not taking any medication that could affect the salivary composition were included. The exclusion criteria comprehended: *in vitro* or *in situ* studies; studies about root caries; reviews and case reports. There was no age restriction.

Quality assessment

Based on the checklist of items that should be included in reports of observational studies (STROBE Statement⁵), twelve criteria were applied to assess the methodological quality of the identified studies regarding the risk of bias (Chart 1). The studies which presented at least 8 of the 12 evaluated criteria were considered with “low risk of bias”; those which presented 4-7 of the criteria were considered with “moderate risk of bias”; and with “high risk of bias” were considered those studies which presented 0-3 evaluated criteria. Moreover, considering the risk of bias (low, moderate and high), the studies were also classified as studies with high, moderate and low evidence, respectively. When classified as “high risk of bias”, that means with low evidence, the studies were excluded from this systematic review.

Results

Electronic searches retrieved 186 non-duplicate records, one additional paper was identified through “related articles” link and another one by hand search. After checking title, abstract and full text of the identified studies, only eleven studies were selected for this systematic review. However, as two of them^{6,7} were excluded because they were classified as “high risk of bias”, a total of nine studies were included in this systematic review, as is shown in Figure 1. From the selected studies, six were classified as “low risk of bias”⁸⁻¹³ and the other three studies as “moderate risk of bias”¹⁴⁻¹⁶. From the six studies with low risk of bias, four of them observed relation between salivary proteins and dental caries^{9,11-13}. Regarding to the three studies with moderate risk of bias, just one of them noted this relation¹⁶. Table 1 summarizes the description of the selected studies.

Discussion

The selected studies for this systematic review were those which better fulfilled a minimum of criteria to make possible to evaluate the role of salivary proteins related to dental caries. Although innumerable studies related to dental caries can be found at scientific database, only nine studies were considered consistent to be analyzed. Among the selected studies, besides salivary protein^{8,10-13,15,16}, salivary protein polymorphism¹⁴ and free amino acids⁹ were also evaluated.

In one of the selected study¹⁶ the sample was divided in more than two groups (healthy: 49 individuals completely free of caries; history of caries: 49 subjects with amalgam or resin fillings and currently free of caries; and active caries: 47 patients with multiple cavities, including enamel and dentine). However, for our analysis, the

subjects with history of caries and active caries were considered as belonging to the same group (caries-susceptible group). Besides, although Tulunoglu et al.¹³ had just two groups in terms of caries experience, these groups were equally subdivided in four other groups according to gender and age (7-10 yrs and 11-15 yrs). Anyway, we just considered two groups (caries-resistant and caries-susceptible groups).

Four studies found statistically significant difference between caries-resistant and caries-susceptible subjects^{11-13,16} in terms of salivary proteins. It was shown evidence that the total protein concentration increases in case of dental caries activity¹³ and that the increased IgA was associated to early childhood caries¹². And also, it was noted moderate evidence that a protein with 17 kDa molecular weight was related to dental caries¹⁶, however, this protein was not identified by the study. Related to the total protein concentration, it must be highlighted that, while Tulunoglu et al.¹³ have found statistically significant results related to total protein and dental caries, it is not corroborated by other studies^{12,15,16} selected for this systematic review. Thus, it must be considered that, probably, there is no relation between total protein concentration and dental caries.

According to free amino acids, it was found high evidence that free arg (arginine) and lys (lysine) concentration in parotid saliva was associated to caries experience, since they showed an inverse relationship with DMF index⁹. According to the authors, elevations in these amino acids could reflect an altered systemic metabolic state common to the caries-resistant subjects. However, regarding to lys, when the DMF-S scores of the caries-susceptible subjects were regressed on free amino acid concentration, a statistically significant positive correlation with lys levels was obtained. Probably this happened because resistance to caries is associated with some threshold level of elevated dibasic amino acid.

On the other hand, another study¹⁴ selected for this systematic review did not observe high evidence of differences in either overall protein pattern or in the distributions of the proline-rich (Pr), parotid acidic (Pa), double band (Db), parotid size variant (Ps), parotid middle band (Pm), or parotid basic (Pb) phenotypes between caries-resistant and caries-susceptible subjects. Due to the wide range of phenotypes, more studies are necessary to evaluate this relation.

Some selected studies^{8,10,15} did not present evidence about the relation between salivary proteins and dental caries. For example, it was demonstrated that the concentration of lysozyme in parotid and submandibular-sublingual saliva is not by itself a critical determinant for resistance or susceptibility to caries⁸. Yet, no significant differences in overall protein composition were found in parotid saliva¹⁰ and whole saliva¹⁵ between caries-susceptible and caries-resistant subjects. So, it was suggested that further evidence concerning the role of salivary proteins in modifying risk for dental caries is necessary¹⁷.

It is difficult to establish a single variable as predictive for dental caries severity probably because the multifactorial etiology of the disease¹⁸. The exposure of sample subjects to systemic fluoride during tooth development, for example, can be considered as a potential confounder. So, it was adopted as an exclusion criterion for some selected studies^{6,8,10,11,13}. On the other hand, other variables, such as, use of xylitol and participation at oral health program (with dental biofilm control) can also be considered as potential confounders. However, even in case of this potential confounders be present, they will not influence the study's result if both groups have received the same treatment (fluoride intake, xylitol or biofilm control).

Nevertheless, regarding to salivary composition, it must be emphasized that the final structure of most proteins and peptides present in whole saliva is defined by

complex series of molecular processes. Thus, knowledge about the dynamic composition of the salivary proteome is important not just for the salivary protein function but also considering the growing interest in saliva-based diagnostics³.

Based on the present systematic review, it was possible to conclude that there are evidences of the relation between salivary proteins and dental caries. However, more investigations are necessary to establish salivary proteins as biomarker for this disease. Sensitive proteomics methodologies, which have opened new avenues for the characterization of very small amounts of organic material, including proteins and peptides¹⁹, are recommended for future studies. Besides, defined criteria are essential to avoid risk of bias due the multifactorial etiology of dental caries. Furthermore, we highlight that salivary proteins present in acquired enamel pellicle must be also considered as an important tool in protection against dental caries, since acquired enamel pellicle is formed onto tooth surface and acts on de/remineralization process.

Acknowledgement

The authors would like to thank CAPES (Brazil) for the financial support.

References

1. Freire MCM, Reis SCGB, Gonçalves MM, Balbo PL, Leles CR. Condição de saúde bucal em escolares de 12 anos de escolas públicas e privadas de Goiânia, Brasil. *Rev Panam Salud Publica* 2010; **28**:86–91.

2. Sikorska MHJ, Mielnik-Blaszczak M, Kapec E. The relationship between the levels of SigA, lactoferrin and α 1 proteinase inhibitor in saliva and permanent dentition caries in 15-year-olds. *Oral Microb Immunity* 2002; **17**: 272–76.
3. Helmerhorst EJ, Oppenheim FG. Saliva: a dynamic proteome. *J Dent Res* 2007; **86**:680-93.
4. Jou YJ, Lin CD, Lai, CH, Chen, CH, Kao, JY, Chen SY, Tsai MH, Huang SH, Lin CW. Proteomic identification of salivary transferrin as a biomarker for early detection of oral cancer. *Analytica Chim Acta* 2010; **681**:41–48.
5. STROBE. <http://www.strobe-statement.org/index.php?id=available-checklists>. 2007.
6. Anderson LC, Mandel ID. Salivary Protein Polymorphisms in Caries-resistant Adults. *J Dent Res* 1982; **61**:1167-68.
7. Cowman RA, Baron SS, Fitzgerald RJ, Danziger JL, Quintana JA. Growth inhibition of oral streptococci in saliva by anionic proteins from two caries-free individuals. *Infection and Immunity* 1982; **37**: 513-18.
8. Stuchell RN, Mandel ID. A comparative study of salivary lysozyme in caries-resistant and caries-susceptible adults. *J Dent Res* 1983; **62**:552-54.
9. VanWuyckhuysse BC, Perinpanayangam HER, Bevacqua D, Raubertas RF, Bilings RJ, Bowen WH, Tabak LA. Association of free arginine and lysine concentrations in human parotid saliva with caries experience. *J Dent Res* 1995; **74**:686-90.
10. Dodds MWJ, Johnson DA, Mobley CC, Hattaway KM. Parotid saliva protein in caries-free and caries-active adults. *Oral Surg Oral Med Oral Radiol Endod* 1997; **83**:244-51.

11. Ayad M, VanWuyckhuysse, Minaguchi K, Roubertas RF, Bedi GS, Billings RJ, Bowen WH, Tabak LA. The association of basic proline-rich peptides from human parotid gland secretions with caries experience. *J Dent Res* 2000; **79**:976-82.
12. Farias DG, Bezerra ACB. Salivary antibodies, amylase and protein from children with early childhood caries. *Clin Oral Invest* 2003; **7**:154–7.
13. Tulunoglu Ö, Dermitas S, Tulunoglu I. Total antioxidant levels of saliva in children to caries, age and gender. *Int Jour Paed Dent* 2006; **16**:186–91.
14. Anderson LC, Lamberts BL, Bruton WF. Salivary protein polymorphisms in caries-free and caries-active adults. *J Dent Res* 1982; **61**:393-396.
15. Shimotoyodome A, Kobayashi H, Tokimitsu I, Hase T, Inoue T, Matsukubo T, Takaesu Y. Saliva-Promoted Adhesion of *Streptococcus mutans* MT8148 Associates with Dental Plaque and Caries Experience. *Caries Res* 2007; **41**:212–218.
16. Roa NS, Chaves M, Gómez M, Jaramillo LM. Association of salivary proteins with dental caries in a Colombian population. *Acta Odontol Latinoam* 2008; **21**:69-75.
17. Banderas-Tarabay JA, Zacarías-D'Oleire IG, Garduño-Estrada R, Aceves-Luna E, González-Begne M. Electrophoretic analysis of whole saliva and prevalence of dental caries. A study in Mexican dental students. *Arch Med Res* 2002; **33**:499-505.
18. Leverett DH, Proskin HM, Featherstone JDB, Adair SM, Eisenberg AD, Mundorffshrestha SA, Shields CP, Shaffer CL, Billings RJ. Caries Risk Assessment in a Longitudinal Discrimination Study. *J Dent Res* 1993; **72**:538-543.

19. Siqueira WL, Helmerhorst EJ, Zhang W, Salih E, Oppenheim FG. Acquired enamel pellicle and its potential role in oral diagnostics. *An. NY Acad Sci* 2007; **1098**: 504–509.

Chart 1: Quality assessment (criteria to evaluate the risk of bias of selected studies)

1. Definition of inclusion criteria;
2. Definition of exclusion criteria;
3. Subjects not exposed to systemic or topical fluoride during tooth development;
4. Description of the dental caries diagnosis criteria;
5. Radiographic exam for dental caries diagnosis;
6. Experienced examiner for dental caries diagnosis;
7. Calibrated examiner;
8. Salivary collection description;
9. Salivary analysis description;
10. Statistical analysis description;
11. Paired groups;
12. Blinded study.

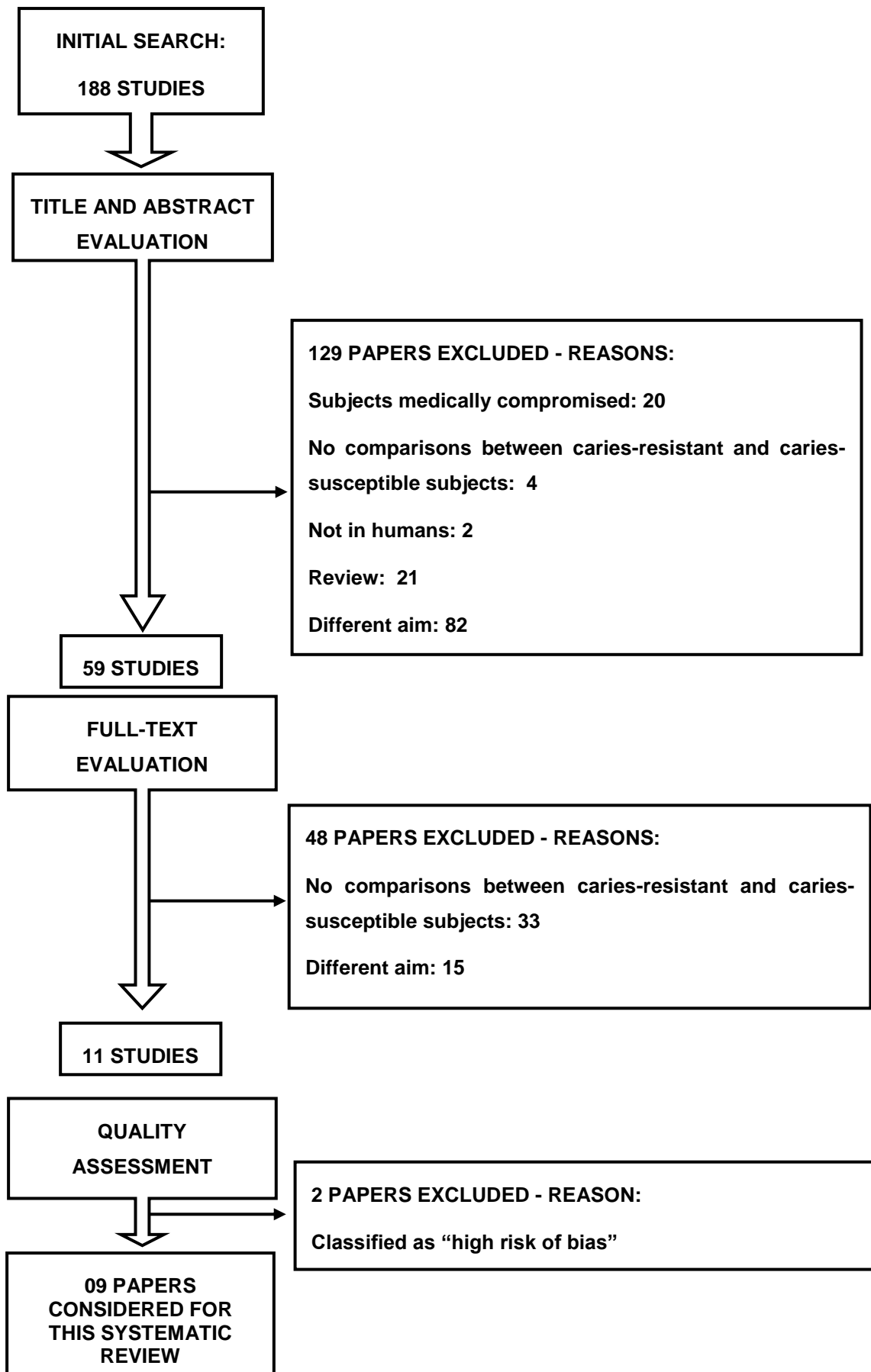


Figure 1: Stages of the studies selection process

Table 1: Description of the selected studies.

AUTHORS/YEAR/ COUNTRY	SAMPLE SIZE (n)	CARIES INDEX	TYPE OF SALIVA	SALIVARY PARAMETERS	DATA ANALYSIS	OTHER CONSIDERATIONS	RESULTS
Anderson et al., 1982 USA	DMF=0: 46 DMF>0: 47	DMF-T	SPS	Salivary protein polymorphisms (Pr, Ps, Db)	χ^2 test	<ul style="list-style-type: none"> Caries-susceptible subjects criteria: ≥ 5 caries lesions with $\frac{3}{4}$ extending through dentin 	No statistically significant difference.
Stuchell & Mandel, 1983 USA	DMF=0: 46 DMF>0:17	DMF-S	SPS and Stimulated and Unstimulated Submandibular and sublingual saliva	Lysozyme	T-test	<ul style="list-style-type: none"> Age: ≥ 25 yrs Caries-susceptible subjects criteria: DMF-S > 15 (≥ 1 new caries lesion within the past yr) 	No statistically significant difference.
VantWuyckhuysse et al., 1995 USA	DMF=0: 20 DMF>0:19	DMF-S	SPS	Free amino acids	Mann-Whitney test, Linear regression and Bonferroni method	<ul style="list-style-type: none"> Age: ≥ 60 yrs 	Arg and lys concentrations were higher in the caries-resistant subjects.
Dodds et al., 1997 USA	DMF=0: 38 DMF>0:49	DMF-S	SPS	Histatin, basic and acidic PRPs, statherin, amylase and uric acid	ANOVA and linear regression	<ul style="list-style-type: none"> Age: $\geq 18-30$ yrs Caries-susceptible subjects criteria: ≥ 5 decayed tooth surfaces requiring restoration 	No statistically significant difference.
Ayad et al., 2000 USA	DMF=0: 9 DMF>0:9	DMF-S	SPS	Basic Proline-rich Peptide	Mann-Whitney and Fisher's exact tests	<ul style="list-style-type: none"> Age: ≥ 60 yrs 	Differences were found in the phenotypes of proline-rich proteins expressed by caries-resistant and caries-susceptible subjects.
Farias & Bezerra, 2003 Brazil	dmi=0: 20 dmi>0:20	dmi-s	UWS	IgA, IgG, total proteins and amylase activity	Mann-Whitney test	<ul style="list-style-type: none"> Age: 12-47 months Caries-susceptible subjects criteria: cavitated lesions on the buccal surface of at least one maxillary anterior tooth 	Total salivary IgA was increased in caries-susceptible subjects.
Tulunoglu et al., 2006 Turkey	DMF=0: 40 DMF>0:40	DMF-S	UWS	Total proteins	Mann-Whitney test and T-test	<ul style="list-style-type: none"> Age: 7-15 yrs Caries-susceptible subjects criteria: ≥ 5 decayed tooth surface requiring restoration 	Total protein concentration increased in caries-susceptible subjects.
Shimotodome et al., 2007 Japan	DMF=0: 9 DMF>0: 12	DMF-S	SPS SWS	Total proteins, amylase, IgA, glycoprotein	Mann-Whitney test and T-test	<ul style="list-style-type: none"> Age: 26-40 yrs (caries- susceptible) and 24-45 yrs (caries-resistant) 	No statistically significant difference.
Roa et al., 2008 Colombia	DMF=0: 49 DMF>0:96	DMF-T	UWS	Total proteins and proteins with different molecular weight	Kruskal-Wallis, Mann-Whitney and χ^2 tests	<ul style="list-style-type: none"> Age: > 18 yrs Caries-susceptible subjects: 49 with history of caries and 47 with active caries 	A 17 kDa molecular weight protein was related to caries-susceptibility.

4.2 Artigo 2

Effect of Dialyzed Saliva on the Human Enamel Demineralization

Running title: Dialyzed saliva and enamel demineralization

Carla Martins^{1,2}, Gloria F. Castro², Michelle F. Siqueira¹, Paula M. Yamaguti¹ and Walter L. Siqueira^{1*}

¹ Department of Biochemistry, Schulich Medicine and Dentistry, University of Western Ontario, Canada

² Department of Pediatric Dentistry and Orthodontics, School of Dentistry, Federal University of Rio de Janeiro, Brazil.

Abstract

Saliva is supersaturated with respect to calcium and phosphate ions. When enamel is in contact with saliva, the negative charges of the enamel surface are immediately neutralized by a layer of ions with opposite charges (hydration layer). Salivary ions may well play a role in the subsequent adsorption of proteins and consequently in the formation of the acquired enamel pellicle (AEP). Among several biological functions, the AEP forms a selectively permeable barrier that regulates demineralization/remineralization processes. This study evaluated the relationship between AEP composition and protective effect against demineralization. Enamel surfaces were coated with whole saliva (WS), parotid saliva (PS), dialyzed WS or dialyzed PS (MWCO 1 kDa) in order to form AEP. Deionized water was applied for control group. Adsorption of salivary proteins onto enamel surface was allowed to proceed for 2 hours at 37°C with gentle agitation. Enamel specimens were then washed with deionized water and immersed into a demineralizing solution (pH 4.5) for 12 days. This solution was used to measure the amount of calcium and phosphate released from enamel specimens after demineralization period. All saliva coated specimens groups showed a higher protection than those not coated with any type of saliva ($p < 0.05$). Furthermore, undialyzed saliva (WS and PS) was more effective in protecting the enamel against demineralization than dialyzed saliva ($p < 0.05$). The present investigation indicates that the ionic composition of saliva can amplify the demineralization protection effect, by drastically reducing acid-induced enamel demineralization.

Keywords: tooth demineralization, dental caries, saliva, salivary proteins, acquired enamel pellicle, ions.

Introduction

The selective adsorption of salivary components onto tooth surface results in the formation of an organic film known as the acquired enamel pellicle (AEP) (Hannig and Joiner, 2006; Siqueira *et al.*, 2007a). The presumed functions of the AEP are the formation of a protective interface between the tooth surface and the oral environment, acting as a selective permeability barrier that regulates demineralization/remineralization processes and dictating the composition of the microbiota that forms on the tooth surface (Hannig and Joiner, 2006).

Recent investigation using state-of-the-art proteomics on the protein composition of *in vivo* AEP has revealed that this natural film contains at least 130 different proteins (Siqueira *et al.*, 2007b). In addition, our group has also characterized low-molecular-weight products present in the AEP showing that clearly more than half of all identified peptides have isoelectric points (pI) below 5.9 and therefore exhibit a negative charge at a pH ranging between 6.8 and 7.2, the pH conditions that prevail in the oral cavity (Siqueira and Oppenheim, 2009). However, despite of AEP be a sophisticated proteome structure and its several important biological functions, information regarding the importance of AEP and its components (such as protein, peptides and ions) on demineralization/remineralization processes are scarce (Siqueira *et al.*, 2010).

Related to ions, it is well known that saliva is supersaturated in relation to enamel with respect to calcium and phosphate ions, which are essential to protect the teeth against demineralization and to promote remineralization (Tenovuo and Lagerlöf, 1994). Regarding to enamel surface, its negative charge is immediately neutralized by a layer of ions with opposite charge (positive charge), mainly calcium, present in

saliva. This positive ions layer is called hydration layer and may, as well, play a role in the subsequent adsorption of proteins/peptides and consequently the composition, structure and function of the AEP (Bernardi, 1971; Hay, 1973; Arends & Jongebloed, 1977; Bennick et al., 1979). Thus, in the current study, the relationship between AEP composition and its protective effect against demineralization was investigated.

We hypothesized that the AEP formed in the absence of salivary ions will provide a limited protection against enamel demineralization since, without the hydration layer formation, different salivary proteins will be adsorbed by the enamel surface. To test this hypothesis, the protective effect of salivary proteins/peptides present in whole saliva (WS) or parotid saliva (PS) that, by dialysis had been depleted of ions (including the two major salivary ions, calcium and phosphate) was assessed. Thus, it was possible to evaluate whether the AEP formed by salivary proteins/peptides in the absence of salivary ions play any potential role in protective properties against *in vitro* enamel demineralization.

Materials and Methods

Saliva Collection

Saliva and teeth collection protocols were approved by the Institutional Review Board of The University of Western Ontario (review number 16181E). Stimulated WS and PS were collected in our laboratory from a healthy, non-medicated individual without any oral disease. A total volume of 10 mL of WS or PS was obtained from each saliva collection. WS was collected by chewing a piece of Parafilm (25 cm², ~1.40 g, American National CanTM, Chicago, IL, USA) and spitting into a graduated tube immersed in ice (Siqueira *et al.*, 2004). After collection, WS was immediately

centrifuged (14,000 x g) at 4°C for 20 minutes and the resulting WS supernatant was separated from the pellet. PS was collected by means of a Lashley Cup device with exogenous stimulation using sugar-free sour lemon candies (“Jolly Rancher”, Hershey Foods Corporation, PA, USA).

Dialysis of Saliva

Both WS supernatant and PS were dialyzed using membrane tubing with a molecular weight cut-off (MWCO) of 1,000 Da (Spectra/Por; Spectrum Laboratories, Inc., Rancho Dominguez, USA). Dialysis was performed using 5 mL of each saliva sample for 16 hours at 4°C against 20 L of deionized water with two water volume changes. The remaining 5 mL aliquots of undialyzed WS supernatant and undialyzed PS were stored at -20°C during the dialysis time. Saliva samples before and after dialysis were applied for SDS-PAGE and calcium, phosphate and total protein concentration measurement, in order to assure the effectiveness of the dialysis procedure.

Total Protein Concentration

The total protein concentration of each saliva sample before and after dialysis procedure was measured using the bicinchoninic acid (BCA) assay (Pierce Chemical, Rockford, USA) and bovine serum albumin protein standard. Total protein concentration was measured spectrophotometrically employing a UV-visible spectrophotometer (Beckman Coulter Inc., Brea CA, USA) determining the O.D. at a wavelength of 562 nm. All samples were analyzed in duplicate.

SDS-PAGE

Aiming to inspect possible qualitative protein loss during the dialysis procedure, 12% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-

PAGE) was performed. Briefly, 30 μ L of sample buffer was added to a microcentrifuge tube containing the equivalent of 20 μ g of total protein for each saliva sample. The tubes were vortexed for 5 seconds at maximum speed and boiled for 5 minutes. After that, the samples were directly placed into the wells of the stacking gel. A constant voltage of 120 V was used for the development of electrophoretic separation and the gel was stained for 16 hours with Coomassie Brilliant Blue R-250 and destained in methanol/acetic acid/water (40%/10%/60% v/v) for 2 hours. Densitometry analysis of protein bands with high, middle and low molecular weight (MW) were carried out with Photoshop CS3 software, version 10.0 (Adobe System, Mountain View, CA, USA).

Enamel Samples Preparation

Permanent molars without fractures, white spots or formation defects were selected, cleaned and rinsed in deionized water. The crowns were sectioned with a diamond-coated band saw (No. 40-6530, Buehler, Whitby, Canada), generating sections of approximately 300 μ m of thickness. Subsequently, the specimens were ground with sandpaper wetted with deionized water to a uniform thickness of 150-160 μ m. The widths of the parallel surfaces were verified by digital micrometer (Marathon, Marathon Watch Company Ltd, Richmond Hill, ON, Canada). All surfaces of the enamel sections, except for a 2 mm window on the enamel surface, were coated with acid-resistant varnish. A dissection microscope (SMZ 1500, Nikon, Japan) containing a scale and a video camera was used to confirm the 2 mm enamel window. A total of 50 enamel specimens were prepared to carry out the present study.

Experimental Design - Enamel Demineralization Assay

The enamel specimens were randomly divided in 5 groups (10 samples/group). Samples of each group were coated with WS, dialyzed WS, PS or dialyzed PS. Those samples from the control group were non-saliva-coated and, for this reason, it was applied deionized water (without addition of any protein and ions). Then, each specimen was exposed to the equivalent of 100 µg of salivary proteins for a period of two hours at 37 °C with gentle agitation in order to form AEP. Control group specimens were exposed to 100 µL of deionized water. After this period, the specimens were washed by dipping once in deionized water. Subsequently, the specimens were disposed into individual tubes containing 3 mL of demineralizing solution (2.2 mM CaCl₂; 2.2 mM NaH₂PO₄; 0.05 M acetic acid; pH 4.5) (Siqueira *et al.*, 2010) for a period of 12 days at 37 °C with gentle agitation. To ensure that the pH of the demineralizing solution did not change, the pH was measured every 3 days using pH paper strip (pHydrion papers, Micro Essential Laboratory, B'klyn, USA). Immediately after the demineralization period, the specimens were washed using deionized water and dried with filter paper to remove any residue of acid on the enamel surface window. The 3 mL of demineralizing solution was employed to determine the calcium and phosphate concentration released from the specimens during the demineralization procedure (Figure 1).

Amount calcium released

The calcium content of the samples was analyzed using a quantitative colorimetric calcium determination assay (QuantiChrom™ Calcium Assay Kit, Bioassay Systems, Hayward, USA). An UV-visible spectrophotometer (Beckman Coulter Inc., Brea CA, USA) was employed determining the O.D. at a wavelength of 612 nm.

Amount phosphate released

The phosphate concentration was measured using the vanadomolybdate method with a UV-visible spectrophotometer (Beckman Coulter Inc., Brea CA, USA) at a wavelength of 390 nm (Margolis and Moreno, 1985). All samples were analyzed in duplicate for calcium and phosphate concentration.

Statistical analyses

Statistical procedures were performed with the software package Minitab 16.1. After checking for normal distribution, the data were submitted to analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test. The level of significance was set at 5%.

Results

To gain insight into the biological functions of WS and PS without salivary ions, we evaluated their *in vitro* effects on the enamel demineralization. WS and PS were dialyzed with a membrane of 1 kDa MWCO to exclude the majority of ions such as phosphate and calcium that have direct participation in demineralization/remineralization processes. Table 1 shows the concentrations of phosphate and calcium from WS and PS before and after dialysis, which was measured to check the efficacy of the dialysis procedure. Clearly, the results demonstrated that these two electrolytes were excluded from the saliva samples by dialysis. Total protein concentration in WS and PS measured before and after the dialysis procedure, revealed a loss of 41% after dialysis in WS samples and 22 % in PS samples (Table 1).

The densitometric values of three different proteins with bands of high (100 kDa), middle (50 kDa) or low (15 kDa) MW (based on protein standard) present in

saliva samples before and after dialysis can be observed in Figure 2. Salivary protein bands with similar electrophoretic mobility were compared among samples before and after dialysis. Those protein bands with high MW showed a density 5% lower in dialyzed WS and 6% lower in dialyzed PS. For protein bands with middle MW, the density was 4% lower in dialyzed WS and 7% lower in PS while for protein bands with low MW the density was 5% lower in dialyzed WS and 6% lower in dialyzed PS.

The pH of demineralizing solution was the same in all measurement during the demineralization period, demonstrating stability. The amounts of calcium dissolved from the enamel specimens by the demineralization procedure are shown in Graphic 1. The control group (not treated with any saliva sample) showed the most drastic calcium loss ($p < 0.05$). Both WS- and PS-treated specimens demonstrated higher inhibition of calcium loss compared with the other three groups ($p < 0.05$). Dialyzed WS and dialyzed PS showed an intermediate degree of calcium loss when compared with control and undialyzed saliva samples ($p < 0.05$). Similar results were obtained in relation to the release of phosphate from enamel specimens after demineralization (Graphic 2). WS, PS and dialyzed PS-treated specimens showed the lowest phosphate loss ($p < 0.05$). However, there was no difference in terms of phosphate release between the enamel sections exposed to dialyzed WS and the control group ($p < 0.05$).

Discussion

Saliva, as a body fluid basically formed by proteins and ions, is important due the execution of multiple physiological functions, such as digestion, swallowing, lubrication, tooth integrity and antimicrobial protection. In addition to its vital role of

maintaining homeostasis of the mouth, saliva is responsible for the formation of the AEP. The AEP exhibits many desirable characteristics for the protection of teeth, including resistance to enamel demineralization and promotion of enamel remineralization (Hannig and Joiner, 2006). However, little is known about the composition, structure and function of this natural protein film as well as its relationship with other salivary components such as ions and lipids. To our knowledge, very few studies have focused on the influence of salivary proteins on enamel demineralization and remineralization processes (Featherstone *et al.*, 1993; Fujikawa *et al.*, 2008; Kosoric *et al.*, 2010). Moreover, the synergism between salivary ions and salivary proteins has not been properly explored yet.

Maturation of the AEP was believed to be necessary for its protective properties against demineralization (Zahradnik *et al.*, 1976; Kautsky and Featherstone, 1993), but several studies cumulatively examining AEP formation time varying from 3 minutes to 7 days suggests that aging of the AEP has only minor relevance regarding protection from demineralization (Kautsky and Featherstone, 1993; Hannig and Balz, 1999; Hannig *et al.*, 2003; Hannig *et al.*, 2004; Hannig *et al.*, 2005). In our study, enamel specimens were incubated with saliva for 2 hours, since many studies shows that AEP reaches a plateau within this period on enamel or hydroxyapatite specimens (Eggen and Rolla, 1983; Lie, 1975; Jensen *et al.*, 1992).

Furthermore, the effectiveness of dialysis on removing calcium and phosphate ions from saliva samples was confirmed by the results presented at Table 1, which shows that these ions were completely removed from WS or PS samples after dialysis procedure. Related to the quality and quantity of salivary proteins in those samples after dialysis, SDS-PAGE of WS and PS before and after dialysis procedure showed no remarkable qualitative or quantitative changes in the salivary protein

profile (Figure 2), demonstrating that the most abundant salivary proteins were not affected by dialysis procedure. In addition, the total protein concentration of WS and PS samples showed a loss of 41% and 22% after dialysis, respectively. This discrepancy in total protein concentration before and after dialysis between WS and PS is related to the nature and type of saliva analyzed. WS proteins are strongly affected by the high proteolytic activity present in the oral cavity (Helmerhorst *et al.*, 2006) that generates protein fragments (peptides) with MW below 1,000 Da, which were lost during the dialysis. This may be the reason for having no statistically significant difference on phosphate release between dialyzed WS and control group. On the other hand, as PS has a weak proteolytic activity, its proteins are less susceptible to proteolysis.

An evident inhibitory effect on the rate of enamel demineralization by salivary proteins of both WS and PS has been demonstrated in this study. The results showed that, independently of the type of saliva sample (WS or PS), enamel samples coated with salivary proteins were more efficient on protecting against enamel demineralization than the non-saliva-coated specimens (control group). However, this effectiveness was significantly higher in undialyzed samples, pointing that those salivary ions could be important to interact with enamel surface forming a more resistant AEP against enamel demineralization. As well, when the ions (specifically calcium and phosphate) are present in saliva, they maintain this fluid supersaturated in relation to enamel surface, influencing the speed of the dynamic process related to enamel demineralization. Another possibility to be considered is that salivary proteins and peptides depleted by dialysis procedure could have a significant role in the AEP formation-function relationship against enamel demineralization. Consequently, dialyzed saliva, both WS and PS, will present a

limited demineralization protection. However, the precise mechanisms of how salivary proteins/peptides reduce mineral dissolution with or without ions remain to be elucidated.

Mass spectrometry and proteomic approaches have demonstrated that many proteins present in the AEP are calcium- or phosphate- binding proteins (Siqueira *et al.*, 2007b). Indeed, some proteins, such as amylase and mucins, which are important constituents of AEP and have shown the ability to bind with calcium ions, are thought to contribute substantially to the protective effect on enamel demineralization. Nevertheless, although these proteins were present on dialyzed saliva samples, they could not be present on AEP formed by dialyzed saliva samples since there was no calcium and phosphate to bind these proteins to enamel surface. This would contribute for the protective effect reduction.

In conclusion, our study demonstrated that the salivary proteins that form the AEP in the absence of salivary ions are able to provide protection against enamel demineralization, however, the highest protective effect is achieved when AEP is formed in the presence of salivary ions, as calcium and phosphate. Consequently, the results highlight the potential importance of salivary ions in conjunction with salivary proteins/peptides as part of the enamel demineralization protective mechanism in the human tooth.

Acknowledgments

This study was supported by Canadian Institutes of Health Research (CIHR grants # 97577 and # 106657); CM was recipient of a doctorate scholarship from CAPES (Brazil) under supervision of WLS and GFC; PMY was a recipient of a fellowship

from Foreign Affairs and International Trade Canada (DFAIT) under supervision of WLS. We are grateful to Dr. Luz Adriana Castro for her cooperation during the preparation of enamel specimens.

References

Arends J, Jongebloed WL (1977). The enamel substrate-characteristics of the enamel surface. *Swed Dent J* 1:215-224.

Bennick A, Cannon M, Madapallimattam G (1979). The nature of the hydroxyapatite-binding site in salivary acidic proline-rich proteins. *Biochem. J* 183, 115-126.

Eggen KH, Rölla G (1983). Further studies on the composition of the acquired enamel pellicle. *Scand J Dent Res* 91:439-46.

Featherstone JDB, Behrman JM, Bell JE (1993). Effect of whole saliva components on enamel demineralization in vitro. *Crit Rev Oral Biol Med* 4:357-62.

Fujikawa H, Matsuyama K, Uchiyama A, Nakashima S, Ujiie T (2008). Influence of salivary macromolecules and fluoride on enamel lesion remineralization in vitro. *Caries Res* 42:37-45.

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

Hannig M, Hess NJ, Hoth-Hannig W, de Vrese M (2003). Influence of salivary pellicle formation time on enamel demineralization – an in situ pilot study. *Clin Oral Invest* 7:158–161.

Hannig M, Fiebiger M, Güntzer M, Döbert A, Zimehl R, Nekrashevycha Y (2004). Protective effect of the in situ formed short-term salivary pellicle. *Arch Oral Biol* 49:903-10.

Hannig C, Hamkens A, Becker K, Attin R, Attin T (2005). Erosive effects of different acids on bovine enamel: release of calcium and phosphate in vitro. *Arch Oral Biol* 50:541-52.

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

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

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

Jensen JL, Lamkin MS, Oppenheim FG (1992). Adsorption of human salivary proteins to hydroxyapatite: a comparison between whole saliva and glandular salivary secretions. *J Dent Res* 1992 71:1569-76.

Kautsky MB, Featherstone JD (1993). Effect of salivary components on dissolution rates of carbonated apatites. *Caries Res* 27:373-7.

Kosoric J, Hector MP, Anderson P (2010). The influence of proteins on demineralization kinetics of hydroxyapatite aggregates. *J Biomed Mater Res*.

Lie T (1975). Pellicle formation on hydroxyapatite splints attached to the human dentition: morphologic confirmation of the concept of adsorption. *Arch Oral Biol* 20:739-42.

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

Siqueira WL, de Oliveira E, Mustacchi Z, Nicolau J (2004). Electrolyte concentrations in saliva of children aged 6-10 years with Down syndrome. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 98:76-9.

Siqueira WL, Helmerhorst EJ, Zhang W, Salih E, Oppenheim FG (2007a). Acquired enamel pellicle and its potential role in oral diagnostics. *Ann N Y Acad Sci* 1098:504-9.

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

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

Siqueira WL, Margolis HC, Helmerhorst EJ, Mendes FM, Oppenheim FG (2010). Evidence of Intact Histatins in the in vivo Acquired Enamel Pellicle. *J Dent Res*.

Tenovou J, Lagerlöf F (1994). Saliva. Thylstrup A and Fejerskov O. In: Textbook of Clinical Cariology. 2nd Ed. Munkgard.

Zahradnik RT, Moreno EC, Burke EJ (1976). Effect of salivary pellicle on enamel subsurface demineralization in vitro. *J Dent Res* 55:664–670.

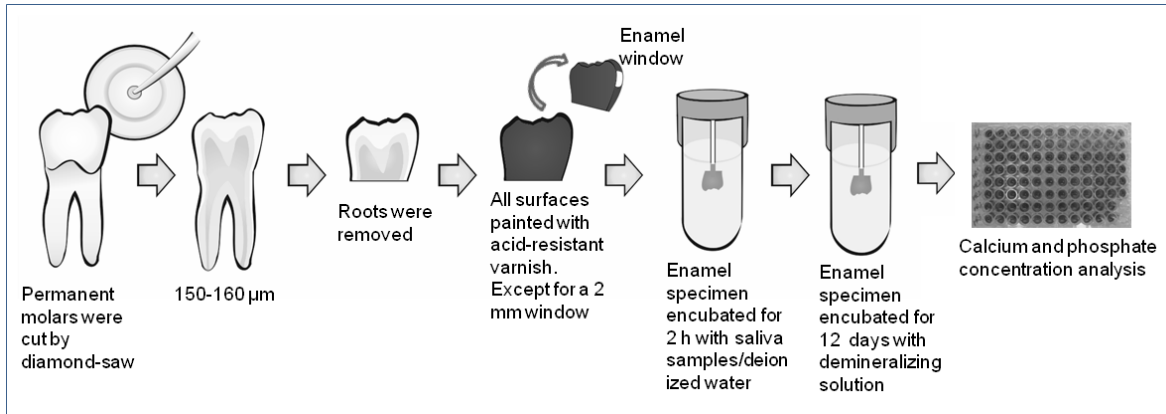


Figure 1: Schematic figure of the study design.

Table 1: Calcium, phosphate and total protein concentrations of saliva samples before and after dialysis procedure.

Type of Saliva	Calcium Concentration (mg/dL)	Phosphate Concentration (mg/mL)	Total Protein Concentration ($\mu\text{g/mL}$)
WS	0.03	4.17	699.77
Dialyzed WS	0	0.45	409.72
PS	0.02	12.24	684.82
Dialyzed PS	0	0.09	524.10

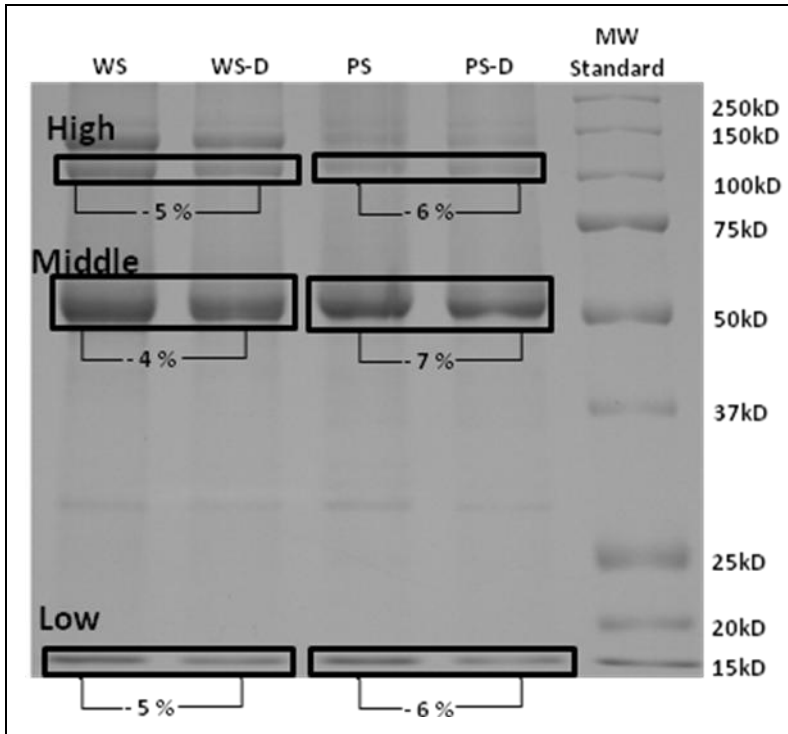
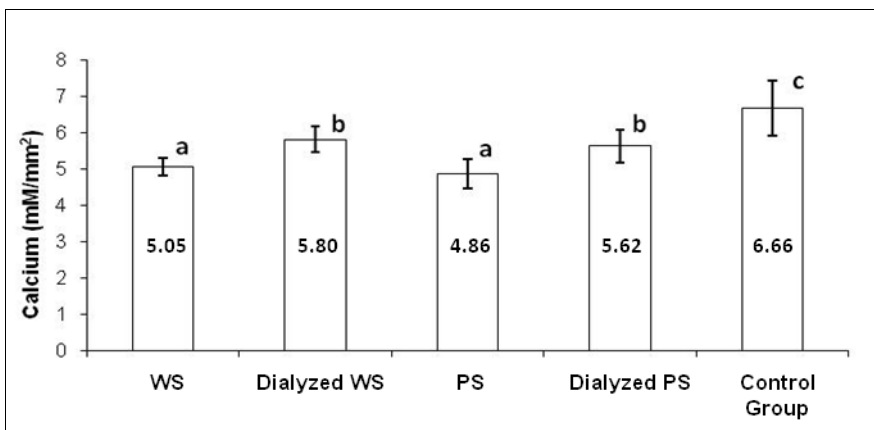


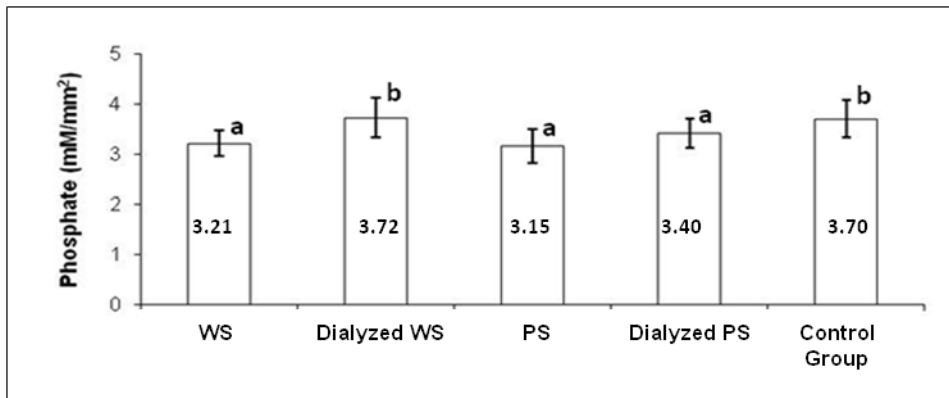
Figure 2: SDS-PAGE gel of saliva samples and densitometry of protein bands.

Graphic 1: Calcium concentration released from enamel specimens during demineralization process.



Anova Test, $p < 0.05$. Note: Different letters among groups showed significant statistical difference.

Graphic 2: Phosphate concentration released from enamel specimens during demineralization process.



Anova Test, $p < 0.05$. Note: Different letters among groups showed significant statistical difference.

5 DISCUSSÃO

A cárie dental continua sendo uma das doenças infecciosas mais comuns na raça humana, mesmo havendo disponibilidade de medidas preventivas como o uso de fluoretos, de selantes e conhecimento a respeito da etiologia bacteriana da doença. Apesar da realização de diversos estudos que visam conseguir desenvolver uma vacina que possa ser aplicada contra essa doença, ainda não há evidências da eficácia para uso em humanos (SMITH, 2010). Desta forma, a busca por descobertas que permitam gerar imunidade, prevenção e/ou propiciar tratamento da doença cárie continua de forma incessante na área científica.

Devido a etiologia de caráter multifatorial da cárie, diversas vertentes são incluídas nesse processo, passando pelo controle do biofilme dental, da dieta, uso de xilitol e até mesmo o emprego de compostos químicos do café (ANTONIO et al., 2010). Contudo, um valioso objeto de estudo é a saliva, que apresenta como uma de suas funções a capacidade de reduzir a incidência de cárie dental (STOOKEY, 2008).

Vários são os aspectos da saliva estudados em relação a doença cárie, dentre eles, o pH, o fluxo e a capacidade tampão. No entanto, sua composição parece ser o mais promissor aspecto para prevenção e tratamento desta doença (VITORINO et al., 2006), principalmente, considerando que a PAE, a qual também protege contra desmineralização do esmalte dentário, é formada por proteínas salivares.

Sendo assim, a identificação de proteínas da saliva que estejam associadas à presença da cárie dental permitirá que estas sejam usadas como biomarcadores para a doença, o que possibilitará que o indivíduo diagnosticado como cárie-susceptível receba um tratamento preventivo mais adequado. Por outro lado, caso a proteína salivar seja associada à saúde bucal, ou seja, ausência de doença cárie, esta poderá ser empregada em produtos para higiene bucal ou para uso profissional a fim de prevenir e tratar a doença. Outro aspecto vantajoso da utilização da saliva para métodos diagnósticos consiste no fato do seu método de coleta não ser invasivo nem doloroso. Além disso, a amostra salivar pode ser facilmente coletada tanto em ambientes médicos como não-médicos.

Por outro lado, a identificação de constituintes específicos da saliva que possam estar envolvidos na proteção contra a cárie ou limitação do risco da doença tem sido frustradas pela dificuldade em demonstrar diferenças significativas de variáveis salivares entre sujeitos cárie-resistentes e cáries-susceptíveis (KARGÜL et al., 1994; JENTSCH et al., 2004). Isso ocorre porque há diversos componentes da saliva, dentre eles, íons, proteínas e peptídeos, que apresentam efeito protetor em relação aos tecidos bucais (TOMITA et al., 2007).

Por esse motivo, no primeiro estudo aqui apresentado foi realizada uma revisão sistemática da literatura com o intuito de avaliar se a doença cárie pode ser explicada pela presença ou ausência de proteínas salivares específicas encontradas em sujeitos clinicamente saudáveis. A resposta para esse questionamento pode contribuir para estabelecer o efeito de proteínas salivares no complexo e dinâmico processo da doença cárie e, conseqüentemente, identificar um instrumento terapêutico que permita o controle desta doença.

Quanto a metodologia, para aqueles sujeitos com CPO ou ceo > 0, foi adotado o termo “cárie-susceptível”, ao invés do termo “cárie-ativo”. Tal escolha se deu pois, apesar do índice CPO/ceo ser constantemente empregado para medir a experiência de cárie, ele é um índice cumulativo baseado em lesões presentes e dentes ou superfícies tratados. E uma vez que a cárie dental não é uma doença contínua, ele pode não refletir a atividade de cárie no momento presente e sim ser um indicador de eventos passados (DODDS et al., 2005; SHAHRABI et al., 2008). Quanto aos sujeitos com CPO ou ceo = 0, estes foram denominados “cárie-resistentes”. Estudos que consideraram como “cárie-resistentes” sujeitos que apresentavam CPO ou ceo > 0 foram excluídos.

Para melhor avaliar os resultados obtidos nos estudos identificados sobre o tema, alguns critérios foram determinados com base na declaração do STROBE (Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology), que visa fortalecer os relatórios de estudos observacionais em Epidemiologia. Com base no número de critérios presentes nos estudos selecionados, estes foram classificados de acordo com o risco de viés e, conseqüentemente, com o potencial de evidência científica sobre o tema. Os estudos com alto risco de viés, ou seja, que apresentavam poucos ou nenhum dos critérios estabelecidos, foram excluídos pois seus resultados não poderiam ser considerados confiáveis devido a falha metodológica por alto risco de viés.

Um dos critérios utilizados para acessar a qualidade metodológica dos estudos foi a determinação da exposição dos sujeitos ao fluoreto sistêmico durante o período de formação dentária como critério de exclusão no estudo, o que ocorreu em cinco dos nove estudos selecionados para a revisão sistemática. Esse cuidado foi tomado porque o uso de fluoreto no período de formação dentária pode ser fator

de confundimento, uma vez que dificulta estabelecer se o indivíduo é intrinsicamente cárie-resistente ou se essa resistência é decorrente da exposição ao fluoreto.

Além da exposição ao fluoreto, outros fatores podem ser considerados como de confundimento, dentre eles a participação do indivíduo em programas de promoção de saúde bucal onde seja realizado controle periódico de biofilme, bem como o uso de xilitol. Pelo fato de nenhum estudo ter abordado essas variáveis na metodologia, acredita-se que não estivessem presentes. Ainda assim, mesmo que estas variáveis estivessem presentes, não teriam grande influência, desde que ambos os grupos, cárie-resistentes e cárie-susceptíveis, tivessem sido expostos ao mesmo tipo de tratamento, seja ele fluoreto, xilitol ou controle de biofilme.

Dentre os nove estudos selecionados para a revisão sistemática, quatro deles apresentaram alta evidência e outro estudo apresentou moderada evidência da relação entre proteína salivar e a doença cárie. Desse modo, é aconselhável que sucessivos estudos sejam desenvolvidos com base em um desenho bem definido, a fim de confirmar os resultados encontrados e elaborar a aplicação clínica do dado obtido. Porém, na literatura pesquisada, não foram encontrados estudos que dessem continuação a estas descobertas.

Como é de interesse do presente estudo obter maior conhecimento sobre formas de proteção contra a desmineralização do esmalte, a partir do segundo estudo foi investigada a influência da formação e dos componentes da PAE na proteção contra a desmineralização do esmalte dentário. Para isso, o procedimento de diálise com membrana de peso molecular de corte igual a 1.000 Da foi realizado com o objetivo de remover os íons cálcio e fosfato das amostras de saliva total e saliva de parótida. Foi avaliado, então, se a PAE formada sem a presença desses

íons, o que implica dizer que não foi formada a *camada de hidratação*, possui o mesmo efeito protetor contra desmineralização do esmalte dentário que a PAE formada por saliva não dializada.

Para melhor entendimento sobre a influência dos íons salivares para a formação da PAE, deve-se destacar que a adsorção de proteínas salivares sobre a superfície do esmalte ocorre de forma seletiva, pois algumas proteínas mostram maior afinidade pela superfície mineral do que outras. Devido a hidroxiapatita, a superfície do esmalte é carregada negativamente em pH normal da cavidade bucal, pois, na hidroxiapatita os grupos fosfatos são posicionados perto da superfície. No entanto, íons de carga oposta, como os íons cálcio presentes na saliva, são atraídos para a superfície do esmalte formando a *camada de hidratação* que contem, principalmente, íons cálcio e fosfato na proporção de 10:1. Por conta da grande presença de cálcio na saliva, a carga da superfície de esmalte na presença de *camada de hidratação* torna-se positiva. Conseqüentemente, a *camada de hidratação* atrairá macromoléculas negativas, por exemplo, fosfoproteínas (TENOVUO & LAGERLÖF, 1994). Deve ser enfatizado que, cerca de 50% das proteínas até então identificadas na PAE *in vivo* apresentam carga negativa (SIQUEIRA et al., 2009).

Desta forma, no caso de saliva livre de íons entrar em contato com a superfície de esmalte, a superfície do esmalte permanecerá negativa e atrairá proteínas com carga positiva. Por esse motivo, sugere-se que a PAE formada por saliva não dializada e dializada, seja ela saliva total ou saliva de parótida, apresentará composição protéica diferente entre si. O que poderá ser comprovado por futuros estudos proteômicos que determinem o perfil protéico da PAE formada por diferentes amostras salivares. Entretanto, no presente estudo, quando avaliado

o efeito protetor da PAE formada na ausência de íons salivares (saliva dializada), constatou-se que seu efeito é reduzido ao comparar com o da PAE formada na presença dos íons (saliva não dializada). Porém, ainda assim, a presença da PAE oferece maior proteção do que sua ausência, como observado no grupo controle.

Estudos sobre outros componentes da PAE tais como, proteínas e peptídeos, devem ser conduzidos na tentativa de se identificar possíveis instrumentos preventivos ou terapêuticos. Sugere-se que atenção especial seja dedicada a fosfoproteínas, principalmente a histatina e estaterina, pois foi identificada a presença de peptídeos dessas proteínas em PAE *in vivo* (Siqueira and Oppenheim, 2009; Siqueira et al., 2010), havendo um único peptídeo de cada uma das proteínas que apresenta grupo fosfato.

O desenho de estudo apresentado no segundo artigo é sugerido para avaliar o efeito protetor da PAE com diferente composição contra a desmineralização dentária. Neste desenho de estudo *in vitro*, a avaliação da perda mineral é feita através da análise de cálcio e fosfato perdidos do esmalte dentário durante o período de desmineralização. Contudo, esse efeito protetor pode ainda ser determinado pela análise de perda mineral através de micro-tomografia computadorizada (Micro-CT), técnica que permite uma análise qualitativa, através da visualização da imagem da lesão de esmalte por desmineralização (figura 1, pág. 55). Além disso, a Micro-CT realiza também uma análise quantitativa, onde a perda mineral é avaliada através do conteúdo mineral ósseo, densidade mineral óssea e o volume da lesão. Sendo, desta forma, uma técnica indicada para estudo de desmineralização e remineralização.

Além do estudo *in vitro* aqui apresentado, outros estudos com o mesmo desenho, incluindo análise da perda mineral através de Micro-CT (figura 2, pág. 55)

estão em andamento pela autora e resultados promissores têm sido obtidos. Nestes estudos, o potencial protetor da PAE composta por proteínas de diferentes pesos moleculares e também por peptídeos da estaterina foi avaliado contra a desmineralização dentária. Em relação aos peptídeos da estaterina, o melhor efeito protetor contra desmineralização foi obtido através de seu único peptídeo fosforilado, o DR-9. Esse resultado indica que os dois grupos fosfato presentes no DR-9 sejam os responsáveis por esta proteção, uma vez que, um peptídeo com mesma composição aminoácida que o DR-9 foi sintetizado, porém, sem a presença dos grupos fosfato, e apresentou efeito protetor significativamente inferior ao seu análogo (Martins et al., 2010). Deste modo, quando finalizados, os resultados obtidos através destes estudos, poderão indicar novos elementos que possam ser empregados (através de dentifrícios, soluções para bochecho, vernizes e saliva artificial) para tratamentos preventivo e/ou curativo da doença cárie, podendo ser este um grande avanço na prática clínica.

6 CONCLUSÕES

Com base na revisão sistemática realizada foi possível constatar que há evidências da relação de proteínas salivares com a cárie dental, porém, mais estudos devem ser conduzidos de forma a certificar a forma com que esses componentes podem ser empregados (como biomarcadores ou para fins preventivos ou terapêuticos) e sua eficácia.

O estudo *in vitro* demonstrou que os grupos nos quais os espécimes dentários foram cobertos por PAE apresentaram maior proteção contra desmineralização do que o grupo controle (ausência de PAE). Porém, quando a PAE foi formada na ausência de íons cálcio e fosfato, o efeito protetor contra desmineralização foi menor do que da PAE formada por saliva não dializada. Isso confirma que a PAE é importante para proteção contra desmineralização, mas a proteção pode ser influenciada pela composição.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Amaechi BT, Higham SM, Edgar WM, Milosevic A. Thickness of acquired salivary pellicle as a determinant of the sites of dental erosion. **J Dent Res.**, v.78, p.1821–1828, 1999.
2. Antonio AG, Moraes R, Perrone D, Maia LC, Santos KRN, Iório NLP, Farah A. Species, roasting degree and decaffeination influence the antibacterial activity of coffee against *Streptococcus mutans*. **Food Chem.**, v.118, p.782-788, 2010.
3. Armstrong WG. Origin and nature of the acquired pellicle. **Proc Roy Soc Med.**, v.61, p.33-40, 1968.
4. Dawes C, Jenkins GN, Tongue CH. The nomenclature of the integuments of the enamel surface of teeth. **Brit Dent Jour.**, v.16, p.65-68, 1963.
5. Dodds MWJ, Johnson DA, Yeh CK. Health benefits of saliva: a review. **Jour Dent.**, v.33, p.223–233, 2005.
6. Hannig M. Ultrastructural investigation of pellicle morphogenesis at two different intraoral sites during a 24-h period. **Clin Oral Investig.**, v.3, p.88-95, 1999.
7. 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 Oral Invest.**, v.7, p.58–161, 2003.
8. Hannig M, Fiebigerb M, Gützerb M, Döbertb A, Zimehlc R, Nekrashevycha Y. Protective effect of the in situ formed short-term salivary pellicle. **Arch Oral Biol.**, v.49, p.903-910, 2004.
9. Hannig M, Joiner A . The structure, function and properties of the acquired pellicle. **Monogr Oral Sci.**, v.19, p.29-64, 2006.
10. Hay DI. Some observations on human saliva proteins and their role in the formation of the acquired enamel pellicle. **J Dent Res.**, v. 48 (Sup 5), p.806-10, 1969.
11. Hay DI. The isolation from human parotid saliva of a tyrosine-rich acidic peptide which exhibits high affinity for hydroxyapatite surfaces. **Arch Oral Biol.**, v.18, p.1531-154, 1973.
12. Hay DI, Schluckebier SK, Moreno EC. Equilibrium dialysis and ultrafiltration studies of calcium and phosphate binding by human salivary proteins. Implications for salivary supersaturation with respect to calcium phosphate salts. **Calcif Tissue Int.**, v.34, p.531-8, 1982.
13. Jentsch H, Beetke E, Göcke R. Salivary analyses and caries increment over 4 years: an approach by cluster analysis. **Clin Oral Invest.**, v.8, p.156-160, 2004.

14. Joiner A, Schwarz A, Philpotts CJ, Cox TF, Huber K, Hannig M. The protective nature of pellicle towards toothpaste abrasion on enamel and dentine. **J Dent.**, v.36, p.360–368, 2008.
15. Kargül B, Yarat A, Tanboğa I, Emekli N. Salivary protein and some inorganic element levels in healthy children and their relationship to caries. **J Marmara Univ Dent Fac.**, v.2, p.434-40, 1994.
16. Martins C, Siqueira WL, Holdsworth DW, Umoh J, Yamaguti PM, Castro GFA. Statherin peptides and their effect on protection against enamel demineralization. In: 27 Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica, 2010, Águas de Lindóia. Brazilian Oral Research - Pesquisa Odontológica Brasileira.. São Paulo : SBPqO, 2010. v. 24. p. 183-183
17. Shahrabi M, Nikfarjam J, Alikhani A, Akhoundi N, Ashtiani M, Seraj B. A comparison of salivary calcium, phosphate, and alkaline phosphatase in children with severe, moderate caries, and caries free in Tehran's kindergartens. **J Indian Soc Pedod Prevent Dent.**, v. 26, p.74-77, 2008.
18. Siqueira WL, Zhang W, Helmerhorst EJ, Gygi SP, Oppenheim FG. Identification of protein components in in vivo human acquired enamel pellicle using LC-ESI-MS/MS. **Jour Proteome Res.**, v.6, p.2152-2160, 2007a.
19. Siqueira WL, Helmerhorst EJ, Zhang W, Salih E, Oppenheim FG. Acquired enamel pellicle and its potential role in oral diagnostics. **An NY Acad Sci.**, v. 1098, p.504–509, 2007b.
20. Siqueira WL, Oppenheim FG. Small molecular weight proteins/peptides present in the in vivo formed human acquired enamel pellicle. **Arch Oral Biol**, v.54, p. 437-444, 2009.
21. 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.
22. Slomiany BL, Murty VLN, Zdebska E, Slomiany A, Gwozdzinski K, Mandel ID. Tooth surface-pellicle lipids and their role in the protection of dental enamel against lactic-acid diffusion in man. **Archs Oral Biol.**, v.31, p. 187-191, 1986.
23. Smith DJ. Dental caries vaccine: prospects and concerns. **Expert Rev Vaccines.**, v.9, p. 1-3, 2010.
24. Stookey GK. The effect of saliva on dental caries. **J Am Dent Assoc.**, v.139, p.11-17, 2008.
25. STROBE. <http://www.strobe-statement.org/index.php?id=available-checklists>. 2007.
26. Tabak LA, Levine MJ, Mandel ID, Ellison SA. Role of salivary mucins in the protection of the oral cavity. **J Oral Pathol.**, v.11, p.1-17, 1982.
27. Tenovuo J, Lagerlöf F. Saliva. Thylstrup A and Fejerskov O. In: **Textbook of Clinical Cariology**. 2nd Ed. Munksgard, 1994.
28. Tomita Y, Miyake N, Yamanaka S. Lipids in human parotid saliva with regards to caries experience. **J Oleo Scie.**, v.57, p.115-121, 2008.

29. Vacca-Smith AM, Bowen WH. In situ studies of pellicle formation on hydroxyapatite discs. **Arch Oral Biol.**, v.45, p.277-291, 2000.
30. Vassilakos N, Arnebrant T, Glantz P-O. An *in vitro* study of salivary film formation at solid/liquid interfaces. **Scand J Dent Res.**, v.101, p.133-7, 1993.
31. Vitorino R, de Moraes Guedes S, Ferreira R, Lobo MJC, Duarte J, Ferrer-Correia AJ, Tomer KB, Domingues PM, Amado FML. Two-dimensional electrophoresis study of *in vitro* pellicle formation and dental caries susceptibility. **Eur J Oral Sci.**, v.114, p.147-153, 2006.
32. Yao Y, Berg EA, Costello CE, Troxler RF, Oppenheim FG. Identification of protein components in human acquired enamel pellicle and whole saliva using novel proteomics approaches. **Jour Biol Chem.**, v.278, p.5300–5308, 2003.
33. Zahradnik RT, Moreno EC, Burke EJ. Effect of salivary pellicle on enamel subsurface demineralization in vitro. **J Dent Res.**, v.55, p.664–670, 1976.
34. Zahradnik RT, Propas D, Moreno EC. In vitro enamel demineralization by streptococcus mutans in the presence of salivary pellicles. **J Dent Res.**, v.56, p.1107-10, 1977.
35. Zahradnik RT, Propas D, Moreno EC. Effect of salivary pellicle formation time on in vitro attachment and demineralization by Streptococcus mutans. **J Dent Res.**, v.57, p.1036–1042, 1978.

8 ANEXOS

ANEXO 1 - APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



Office of Research Ethics

The University of Western Ontario
 Room 4180 Support Services Building, London, ON, Canada N6A 5C1
 Telephone: (519) 661-3036 Fax: (519) 850-2466 Email: ethics@uwo.ca
 Website: www.uwo.ca/research/ethics

Use of Human Subjects - Ethics Approval Notice

Principal Investigator: Dr. W.L. Siqueira

Review Number: 16181E

Review Level: Expedited

Review Date: May 14, 2009

Protocol Title: Composition, Structure and Function of Salivary Proteins

Department and Institution: Dentistry, University of Western Ontario

Sponsor: NSERC-NATURAL SCIENCES ENGINEERING RSRCH COU

Ethics Approval Date: June 25, 2009

Expiry Date: June 30, 2016

Documents Reviewed and Approved: UWO Protocol, Letter of Information and Consent, Advertisement

Documents Received for Information:

This is to notify you that The University of Western Ontario Research Ethics Board for Health Sciences Research Involving Human Subjects (HSREB) which is organized and operates according to the Tri-Council Policy Statement: Ethical Conduct of Research Involving Humans and the Health Canada/ICH Good Clinical Practice Practices: Consolidated Guidelines; and the applicable laws and regulations of Ontario has reviewed and granted approval to the above referenced study on the approval date noted above. The membership of this REB also complies with the membership requirements for REB's as defined in Division 5 of the Food and Drug Regulations.

The ethics approval for this study shall remain valid until the expiry date noted above assuming timely and acceptable responses to the HSREB's periodic requests for surveillance and monitoring information. If you require an updated approval notice prior to that time you must request it using the UWO Updated Approval Request Form.

During the course of the research, no deviations from, or changes to, the protocol or consent form may be initiated without prior written approval from the HSREB except when necessary to eliminate immediate hazards to the subject or when the change(s) involve only logistical or administrative aspects of the study (e.g. change of monitor, telephone number). Expedited review of minor change(s) in ongoing studies will be considered. Subjects must receive a copy of the signed information/consent documentation.

Investigators must promptly also report to the HSREB:

- changes increasing the risk to the participant(s) and/or affecting significantly the conduct of the study;
- all adverse and unexpected experiences or events that are both serious and unexpected;
- new information that may adversely affect the safety of the subjects or the conduct of the study.

If these changes/adverse events require a change to the information/consent documentation, and/or recruitment advertisement, the newly revised information/consent documentation, and/or advertisement, must be submitted to this office for approval.

Members of the HSREB who are named as investigators in research studies, or declare a conflict of interest, do not participate in discussion related to, nor vote on, such studies when they are presented to the HSREB.



Chair of HSREB: Dr. Joseph Gilbert

Ethics Officer to Contact for Further Information

Janice Sutherland
 (jsuther@uwo.ca)

Elizabeth Wamboldt
 (ewambolt@uwo.ca)

Grace Kelly
 (grace.kelly@uwo.ca)

Denise Grafton
 (dgrafton@uwo.ca)

This is an official document. Please retain the original in your files.

cc: ORE File

9 APÊNDICE

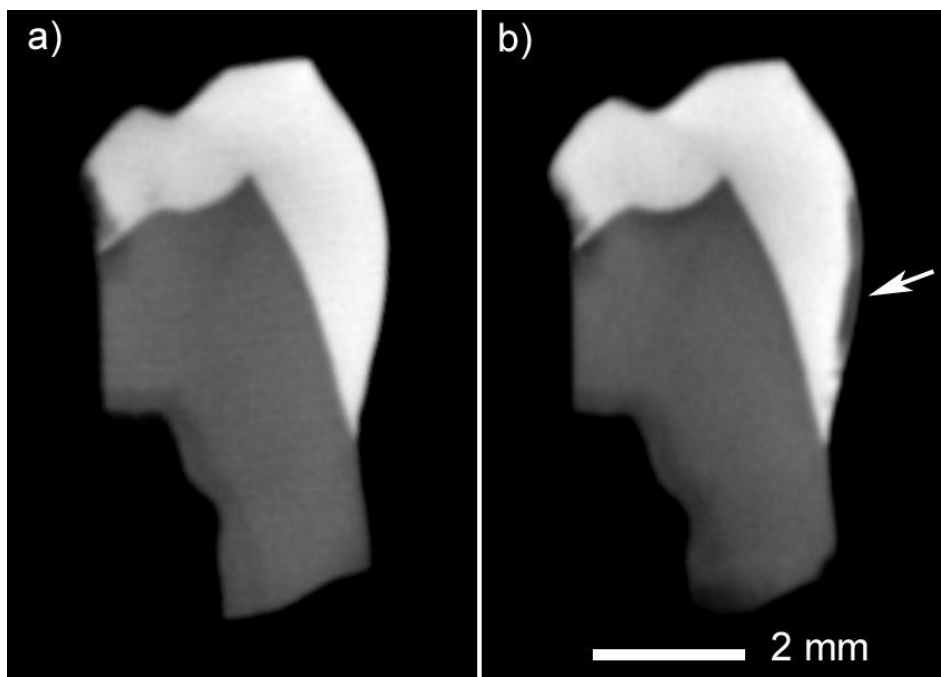


Figura 1: Imagem de micro-tomografia computadorizada de amostra dentária encubada com saliva total antes (a) e após o processo de desmineralização (b). Nota: A seta indica a lesão por desmineralização no esmalte dentário.

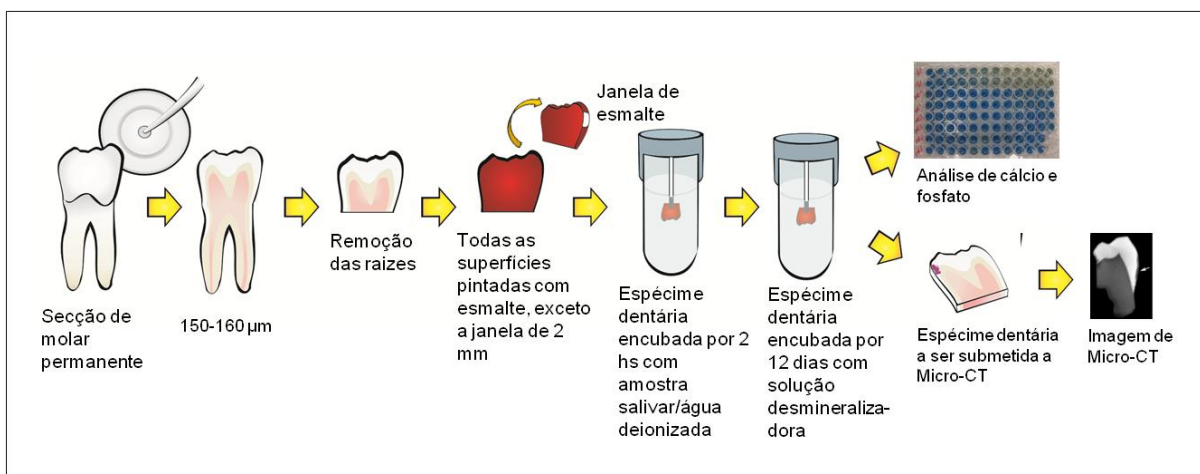


Figura 2: Figura esquemática do desenho de estudo.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)