

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E
BIOLOGIA MOLECULAR**

**MAPEAMENTO PROTEICO DA MATRIZ DO ESMALTE DE
INCISIVOS DE CAMUNDONGOS SUSCEPTÍVEIS E RESISTENTES
À FLUOROSE DENTÁRIA**

São Carlos

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTROS DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E
BIOLOGIA MOLECULAR

MAPEAMENTO PROTEICO DA MATRIZ DO ESMALTE DE
INCISIVOS DE CAMUNDONGOS SUSCEPTÍVEIS E RESISTENTES
À FLUOROSE DENTÁRIA

Tese apresentada à Universidade Federal de São Carlos, junto ao programa de pós-graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciências, área de concentração em Bioquímica e Biologia Molecular.

Autora: Aline de Lima Leite

Orientação: Profa. Dra. Marília A. R. Buzalaf

São Carlos

2015

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

L533mp

Leite, Aline de Lima.

Mapeamento proteico da matriz do esmalte de incisivos de camundongos susceptíveis e resistentes à fluorose dentária / Aline de Lima Leite. -- São Carlos : UFSCar, 2015. 133 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2015.

1. Genética. 2. Amelogênese. 3. Proteômica. 4. Esmalte dentário. 5. Fluorose dentária. 6. Biomineralização. I. Título.

CDD: 575.1 (20^a)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia
Molecular

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado da candidata Aline de Lima Leite, realizada em 12/08/2015:



Profa. Dra. Marília Afonso Rabelo Buzalaf
USP



Prof. Dr. Flávio Henrique da Silva
UFSCar



Profa. Dra. Maria Teresa Marques Novo Mansur
UFSCar



Prof. Dr. Victor Elias Arana-Chavez
USP



Prof. Dr. Rodrigo Cardoso de Oliveira
USP

Dedicatória

À DEUS

Por ter me presenteado com o dom da vida. Por ter me dado forças para chegar onde muitos disseram que era impossível para mim!

... E quando eu pensei que não iria mais suportar, Deus me fez levantar e recomeçar...

Não sei o que me espera no futuro, mas entrego-o nas Tuas mãos!

Obrigada Senhor!

Tudo posso naquele que me fortalece.

Filipenses 4:13

Aos meus pais, Adelaide e Francisco

Muitas vezes trabalharam dobrado, sacrificando seus sonhos em favor dos meus. Obrigada pelo amor, compreensão e apoio incondicional!

. . e, hoje, só quero dizer que amo vocês!

Dedico este trabalho.

*“Bom mesmo é ir à luta com determinação,
Abraçar a vida com paixão,
Perder com classe
E vencer com ousadia
Porque o mundo pertence a quem se atreve
E a vida é muito, para ser insignificante.”
Charles Chaplin*

Agradecimentos Especiais

Aos meus irmãos Erick e Francielly e a minha cunhada Hevellen,

Obrigada pela força e apoio sempre presentes e pela alegria de convivência! Amo vocês!

À minha querida amiga Mileni

E lá se vão 13 anos desde que nos conhecemos, e é incrível como parece que foi ontem... como nossa amizade somente se fortalece a cada dia. E o que dizer de uma pessoa tão especial para mim, que mudou minha vida simplesmente por estar nela. Sobre alguém que me faz rir até você não poder mais parar. Alguém que me faz acreditar que realmente tem algo bom no mundo, que me dá forças nas horas difíceis sempre segura minha mão e diz que vai ficar tudo bem...

Não sou uma pessoa perfeita, cometo erros e aqui deixo aqui meu profundo agradecimento por ser paciente e por me aceitar como sou!

Mi, agradeço a Deus por ter colocado você na minha vida e peço que Ele te abençoe todos os dias, pois você merece tudo de melhor! Obrigada por sempre estar ao meu lado, principalmente nos momentos difíceis. Amo você minha querida amiga-irmã e torço muito para que você encontre seu lugar ao sol logo...

Ao meu maravilhoso trio Nathalia, Gabriel e Rafael

Puxa vida, já se passaram 15 anos de convivência e nossa amizade se fortalece a cada dia. Desde que nos conhecemos estabelecemos uma relação honesta, sincera e harmoniosa e fico muito feliz ao ver o verdadeiro e profundo carinho que nos une e nos acompanha. Agora já com 16 anos de idade chegaram ao limiar da juventude e prepararam-se para novas responsabilidades, novas descobertas, novas emoções. E nesta incrível fase de nossas vidas e eu estarei aqui, para apoiar-los e ajudar-los sempre que precisarem. Afinal, nossa amizade é assim... Cheia de amor, carinho, cumplicidade, risos e choros... Mas ela é verdadeira, única e especial. Vocês sempre estarão em um lugar muito especial em meu coração.

Obrigada pelo amor, carinho e o apoio de vocês. Nossos momentos serão eternos para mim!

Ama vocês!!

Ao meu querido sobrinho Yago

A primeira vez que vi meu pequenino foi o dia mais incrível da minha vida. Simplesmente não existia mais nada além da sua mãozinha fechada e respiração tranquila e aquela carinha redonda mais linda. Hoje já com seis aninhos ele me encanta e enche meus dias de alegria e felicidade.

A titia te ama muito!

A minha querida orientadora Marília Buzalaf

Às vezes concordamos, em outras discordamos, mas você faz parte da minha vida de um modo extremamente especial! Passamos por muitas coisas boas, muitas conquistas, enfrentamos dificuldades e celebramos muitos triunfos que alcançamos. Tudo isso apenas fortaleceu o amor e carinho que temos uma pela outra.

Quero aqui deixar meu agradecimento pelos preciosos conselhos, pelo carinho, por toda dedicação. Obrigada por toda confiança que em mim depositou e por nunca ter duvidado de mim e por tantas vezes ter juntado o seu sorriso ao meu, e outras tantas as suas lágrimas às minhas.

Amizade como a sua é rara e inestimável, e por ter vindo enriquecer a minha vida com a sua existência, com a sua amizade, eu lhe agradeço de todo coração e espero que tenhamos muitos e muitos motivos mais para comemorar!

Com Amor, Aline

A todos vocês meus sinceros agradecimentos!

Agradecimentos Aos Amigos

Aos queridos amigos Marília, Claudio, América, Sônia, Liza, Fernando, Henrique e Mariana.

À Renata, tia Lourdes, Júnior, tia Leonor, Dr. Wadi, Fabiane, Claudio, Thiago, Fernando, Flávio, Camila, Flávia, Gão e Gabriela.

À tia Neide, tio Peres (in memoriam), Renata, Danilo, Fernanda, Cássio, Alexandre e Isa

Aos meus amigos da Bioquímica Luiza, Senda, Thelma, Larissa, Rodrigo, Flávia Dano, Flávia Amadeu, Heloisa, Talita, Cintia, Isabela, Tatiana, Aline Dionizio, Ana Carolina, Amanda, Adriana, Lucas, Cristiane, Beatriz, Priscila e Bruno.

Aos amigos Fernanda Lucki, Guilherme, Maria Cecília, Tatiana e Graziela

Aos meus colegas de Pós-graduação.

A Ivanildes, secretária da seção de Pós-graduação pela atenção, gentileza e disponibilidade em sempre nos ajudar.

Palavras nunca serão suficientes para expressar meus sentimentos de amor e carinho e gratidão por vocês. Obrigada pelos ótimos momentos de convívio...

Agradecimentos Institucionais

Inicialmente agradeço à Universidade Federal de São Carlos na pessoa de seu Reitor Prof. Dr. Targino de Araújo Filho e Vice-Reitor Prof. Dr. Adilson Jesus Aparecido de Oliveira, pela oportunidade de cursar o Doutorado nesta instituição de referência e excelência em nosso país.

Ao Centro de Ciências Humanas e Biológicas (CCHB) na pessoa de sua Diretora Prof.^a Dr^a Kelen Cristina Leite.

Ao departamento de Genética e Evolução (DGE) e a todos os docentes, que direta ou indiretamente contribuíram para minha formação.

À Faculdade de Odontologia de Bauru (FOB-USP), pela estrutura fornecida.

À FAPESP, pelo indispensável auxílio financeiro fornecido através dos auxílios 2008/03489-2 e 2009/53852-9.

Muito obrigada!

Resumo

O desenvolvimento do esmalte dentário é um processo complexo no qual as proteínas da matriz do esmalte interagem para conduzir a deposição e o crescimento dos cristais de hidroxiapatita. Fatores como a exposição excessiva ao fluoreto podem atrapalhar esse processo, resultando em uma patologia conhecida como fluorose dentária. Recentemente tem sido relatado que fatores genéticos podem influenciar as respostas dos tecidos mineralizados ao fluoreto, fenômeno observado nas linhagens de camundongos A/J, tida como susceptível e 129P3/J, tida como resistente. Neste sentido, este estudo objetivou mapear as proteínas do esmalte de incisivos de camundongos A/J e 129P3/J, a fim de que se possa melhor entender os mecanismos moleculares envolvidos na patogênese da fluorose dentária. Para isso, amostras de matriz de esmalte foram obtidas de camundongos das linhagens A/J e 129P3/J e analisadas por eletroforese bidimensional e cromatografia líquida, associadas a espectrometria de massas. Foi identificada um total de 120 proteínas, das quais 113 são proteínas bem caracterizadas, tanto experimentalmente quanto funcionalmente, e 7 proteínas que foram classificadas como proteínas não caracterizadas. Após enriquecimento funcional utilizando ferramentas de bioinformática, verificou-se que 9 proteínas estavam significativamente relacionadas aos termos “odontogênese e biomineralização de tecidos”. Dentre essas, as proteínas COL1A1 e COL1A2 chamaram atenção, uma vez que o colágeno não é associado à amelogênese. As proteínas estavam presentes no esmalte em fase de secreção de ambas as linhagens, e, além disso, a análise de interação *in silico* mostrou a existência de interação física entre a enamelinina e outros tipos de colágeno. Outro achado interessante foi a possibilidade da sequência não caracterizada Q8BIS2 ser uma proteína extracelular da matriz envolvida na degradação das proteínas de matriz. Em conclusão, os resultados levam a crer que o colágeno está presente no esmalte e é provável que tenha participação na amelogênese. Além disso, a existência de uma enzima ainda não caracterizada pode ser a chave para elucidação dos mecanismos envolvidos na biomineralização bem como na susceptibilidade genética à fluorose dentária.

Palavras chaves: Amelogênese; Análise proteômica; esmalte; fluorose; biomineralização

Abstract

Enamel formation is a two-step complex process by which proteins are first secreted to forming an extracellular matrix, followed by massive protein degradation simultaneously with the completion of mineralization. Excessive exposure to fluoride can disrupt this process and drive to a condition known as dental fluorosis. Recently it has been reported that genetic factors may influence the responses of mineralized tissues to fluoride, a phenomenon observed in A/J and 129P3/J mice strain. The present study aimed to map the protein profile of mouse enamel. Enamel matrix samples were obtained from A/J and 129P3/J mice and analyzed by two-dimensional electrophoresis and liquid chromatography, coupled to mass spectrometry. A total of 120 proteins were identified, from which 113 are well characterized, both experimentally and functionally. Seven proteins were classified as uncharacterized proteins. After functional enrichment, 9 proteins were significantly related to the terms "odontogenesis and tissue biomineralization". Surprisingly, the COL1A1 and COL1A2 protein were found on secretory stage enamel of both strains. Protein interaction analysis showed interaction between the ENAM and other types of collagen. Another interesting finding was the possibility of uncharacterized sequence Q8BIS2 be an extracellular matrix protein involved on degradation of matrix proteins. These findings suggest that collagen is present on dental enamel and it seems to have a role in amelogenesis. Furthermore, the existence of a new enzyme could be the key to elucidation of the mechanisms involved in the enamel biomineralization and the genetic susceptibility to dental fluorosis.

Key-words: fluoride; proteomic analysis; amelogenesis; fluorosis, biomineralization.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	39
1.1 CARACTERIZAÇÃO DA FLUOROSE DENTÁRIA	39
1.2 AMELOGÊNESE E OS EFEITOS DO FLUORETO NOS AMELOBLASTOS	41
1.3 PROTEÍNAS DA MATRIZ DO ESMALTE.....	45
1.4 ANÁLISE PROTEÔMICA	51
2 OBJETIVOS	61
2.1 GERAL	61
2.2 ESPECÍFICOS	61
3 MATERIAL E MÉTODOS	65
3.1 OBTENÇÃO DOS ANIMAIS E COLETA DE AMOSTRAS	65
3.2 OBTENÇÃO DO PROTEOMA DE ESMALTE	68
3.2.1 Extração das proteínas.....	68
3.2.2 Eletroforese bidimensional associada a MS (2D-PAGE-MS).....	68
3.2.3 Cromatografia líquida de <i>ultraperformance</i> acoplada a espectrometria de massas (UPLC-MS/MS).....	71
3.3 ANÁLISE COMPUTACIONAL	72
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	77
4.1 ANÁLISE MORFOLÓGICA	77
4.2 ANÁLISE PROTEÔMICA	78
4.2.1 Proteínas caracterizadas.....	88
4.2.2 Proteínas não caracterizadas	98
5 CONCLUSÃO	111
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	115
ANEXO A	133

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Casos de fluorose dentária. Em **a** fluorose de grau leve; **b** fluorose moderada; **c** fluorose severa. Modificada de DENBESTEN e LI, 2011..... 40
- Figura 2.** Microscopia eletrônica de varredura mostrando a camada do esmalte sobre a dentina (NANCI, 2012). 42
- Figura 3.** Representação esquemática das diferentes etapas funcionais no ciclo de vida de ameloblastos durante a amelogênese em incisivos de roedores (figura elaborada pelo autor). 44
- Figura 4.** MEV de incisivos fraturados mostrando os defeitos de formação no esmalte. (A) Camundongo wild type. (B) Esmalte de camundongo nulo para *Amel*. Não apresenta estrutura prismática normal e sua espessura é notoriamente reduzida em comparação com wild type (GIBSON; YUAN; HALL et al., 2001). Camundongos Heterozigoto +/- para *Ambn* (C) e Homozigoto -/- para *Ambn* (D). Observa-se em D uma camada com grande displasia e superfície rugosa sobre a dentina, bem como ausência total de padrão prismático (FUKUMOTO; KIBA; HALL et al., 2004). Em (E) Heterozigoto +/- para *Enam* e (F) Homozigoto -/- para *Enam*. Nota-se que o esmalte formado em F não é mineralizado, mas apresenta uma grande semelhança com a matriz do esmalte (FUKAE; TANABE; UCHIDA et al., 1993). E: esmalte, D: dentina, dE: esmalte defeituoso, AM: Ameloblastos, Od: Odontoblastos; pontas de seta em E e F indicam a junção amelodentinária 49
- Figura 5.** Distribuição da abundância de proteína em escala logarítmica do número de cópias por célula. A análise proteômica convencional detecta proteínas altamente abundantes, e se estende por cerca de quatro ordens de grandeza. Conforme o número de cópias diminui, maior deve ser o tamanho da amostra. O "canto escuro" representa o maior desafio para o proteoma (ZUBAREV, 2013). 53
- Figura 6.** Etapas envolvidas no processo de separação de proteínas por eletroforese bidimensional (LEITE, 2010). 55
- Figura 7.** Representação esquemática de uma Cromatografia Líquida Multidimensional (MDLC) associada a espectrometria de massas. 56
- Figura 8.** Os diferentes processos de ionização da amostra (**a** e **b**), bem como as diferentes configurações dos analisadores de massas utilizados (**c**, **d**, **e**, **f**, **g** e **h**) (AEBERSOLD e MANN, 2003). 58
- Figura 9.** Representação do procedimento de coleta da matriz do esmalte. Em **a**, diagrama de um incisivo de camundongo ilustrando a localização aproximada das zonas 1 e 2 correspondentes à matriz de secreção e maturação respectivamente. Em **b**, uma foto reprodutiva do procedimento experimental. 67

- Figura 10.** Fotomicrografia das regiões de secreção (a e b) e maturação (c e d) de camundongos A/J e 129P3/J, respectivamente. Ameloblasto secretor (→), ameloblasto maturador (→), esmalte em fase de secreção (EFS), esmalte em fase de maturação (EFM), dentina (D). 78
- Figura 11.** Diagrama de Venn comparando as proteínas encontradas para o esmalte em fase de secreção (EFS) das linhagens A/J e 129P3/J, e para o esmalte em fase de maturação (EFM) de ambas linhagens. O número em cada área do diagrama indica o número de proteínas associada entre os diferentes grupos. 80
- Figura 12.** Gel bidimensional representativo para amostras provenientes do esmalte de secreção de animais da linhagem A/J (A) e 129P3/J (B). As proteínas foram focalizadas em strips de 13 cm e faixa de pH 3-10 linear, e em seguida separadas pela massa molecular em gel de poliacrilamida 5-20% e coradas com azul de Coomassie coloidal G250. 81
- Figura 13.** Gel bidimensional representativo para amostras provenientes do esmalte de maturação de animais da linhagem A/J (A) e 129P3/J (B). As proteínas foram focalizadas em *strips* de 13 cm e faixa de pH 3-10 linear, e em seguida separadas pela massa molecular em gel de poliacrilamida em gradiente 5-20% e coradas com azul de Coomassie coloidal G250. 82
- Figura 14.** Cromatogramas obtidos para amostras de esmalte de fase de secreção e fase de maturação provenientes de incisivos de animais da linhagem 129P3/J (a e b) e A/J (c e d). 83
- Figura 15.** Mapa da localização celular anotada para as proteínas identificadas, obtido através do ClueGO (κ score $\geq 0,4$). 89
- Figura 16.** Categorização das proteínas identificadas de acordo com “processo biológico”, obtido através do ClueGO (κ score $\geq 0,4$). 91
- Figura 17.** Rede de interação obtida *in silico*, mostrando as interações entre as proteínas encontradas (azul) com outras proteínas. Chama a atenção as interações da ENAM (O548P8) como colágeno tipo 5 (O88207), colágeno tipo 2 (P28481), ANXA2 (P07356) e AHSG (P29699). Esta última também interage diretamente com a AMELX (P63277) 96
- Figura 18.** Gráficos de Ramachandran demonstrando o arranjo espacial estereoquímico dos resíduos de aa. 101
- Figura 19.** Modelos estruturais obtidos para a sequência Q9CY06. Em a estrutura secundária predita com base na sequência de aa e em b estrutura terciária elaborada com base na homologia. 105
- Figura 20.** Modelos estruturais obtidos para a sequência Q9CY10. Em a estrutura secundária predita com base na sequência de aa e em b estrutura terciária elaborada com base na homologia. 106

- Figura 21.** Modelos estruturais obtidos para a sequência Q3TGC5. Em **a** estrutura secundária predita com base na sequência de aa e em **b** estrutura terciária elaborada com base na homologia. 106
- Figura 22.** Modelos estruturais obtidos para a sequência Q3UGS1. Em **a** estrutura secundária predita com base na sequência de aa e em **b** estrutura terciária elaborada com base na homologia. 107
- Figura 23.** Modelos estruturais obtidos para a sequência Q9CV72. Em **a** estrutura secundária predita com base na sequência de aa e em **b** estrutura terciária elaborada com base na homologia. 107
- Figura 24.** Modelos estruturais obtidos para a sequência Q3UTK0. Em **a** estrutura secundária predita com base na sequência de aa e em **b** estrutura terciária elaborada com base na homologia. 108
- Figura 25.** Modelos estruturais obtidos para a sequência Q8BIS2. Em **a** estrutura secundária predita com base na sequência de aa e em **b** estrutura terciária elaborada com base na homologia. 108

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Proteínas encontradas em esmalte de camundongos através da abordagem 2D-PAGE-MS.....	84
Tabela 2. Proteínas encontradas em esmalte de camundongos através da abordagem UPLC-MS/MS.....	86
Tabela 3. Proteínas associadas termos do GO após enriquecimento funcional para o “componente celular”.....	90
Tabela 4. Proteínas associadas termos do GO após enriquecimento funcional para “processos biológicos”.....	92
Tabela 5. Propriedades físico-químicas das proteínas hipotéticas.....	99
Tabela 6. Qualidades estéreo-químicas dos modelos obtidos.	100
Tabela 7. Funções inferidas para dos modelos de proteínas com base na classificação funcional do GO obtida através do 3d2GO.....	102

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

- > - Maior que
- < - Menor que
- % - Porcentagem
- ± - Mais ou menos
- ≈ - Aproximadamente
- ≥ - Maior ou igual que
- °C - Graus Celsius
- µg - Micrograma
- µL - Microlitro
- µm - Micrômetro
- µM - Micromolar
- 2D-PAGE - Two dimensional electrophoresis (eletroforese bidimensional)
- 2D-PAGE-MS - Eletroforese bidimensional associada à espectrometria de massas
- aa - aminoácidos
- AC - Affinity chromatography
- ACN - Acetonitrila
- ADH - Alcohol dehydrogenase
- AMB1 -
- AmBic - Ammonium Bicarbonate (Bicarbonato de amônio)
- AMBN - Ameloblastina
- AMEL - Amelogenina
- Arg - Arginina
- Asp - Ácido aspartico
- ATP - Adenosina trifosfato
- Ca⁺⁺ - Cálcio
- CHAPS - 3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate
- DEJ - Junção amelodentinária
- DNA - Ácido desoxiribonucleico
- DTT - Ditioneitol
- EDTA- Ethylenediamine tetraacetic acid (ácido etilenodiamino tetra-acético)
- EFM - Esmalte em fase de Maturação
- EFM - Esmalte em fase de maturação
- EFS - Esmalte em fase de secreção
- EFS - Esmalte em fase de secreção
- ENAM - Enamelina
- ESI - Electrospray Ionization (Ionização por Eletrospray)
- F⁻ - Fluoreto
- Fe - Ferro
- FT - Fourier transform (transformada de Fourier)
- g - Força centrífuga

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

g - Gramas
Glu - Ácido glutâmico
GO - Gene Ontology
GRAVY - Grand average of hydropathy
h - Hora
HE - Hematoxilina e Eosina
HPLC - High Performance Liquid Chromatography (Cromatografia líquida de alta performance)
IAA - Iodoacetamida
ID - Identificador
IEF - Isoelectric focalization (Focalização isoelétrica)
IPG - Immobilized pH gradient (Gradiente de pH imobilizado)
IT - Ion Trap (Armadilha de íons)
K⁺ - Potássio
KDa - Quilodalton(s)
Kg - Quilograma
kV - Quilovolts
L - Litros
LC - Liquid Chromatography (Cromatografia líquida)
LC-MS/MS - Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas
Lys - Lisina
M - Molar
m/z - Razão entre a massa e a carga
mA - Miliamper
MALDI - Matrix-assisted laser desorption ionization (Ionização por desorção a laser assistida por matriz)
MDLC - Multidimensional Liquid Chromatography (Cromatografia líquida multidimensional)
mg - Miligramas
min - Minutos
mL - Mililitros
MM - Massa molecular
mm - Milímetros
mM - Milimolar
mRNA - RNA mensageiro
MS - Mass spectrometry (Espectrometria de massas)
n - número de
ng - Nanogramas
nHPLC - cromatografia líquida em escala nano
nm - Nanômetros
ORF - Open reading frame (quadros de leitura abertos)
p/v - peso/volume

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

pH - Potencial hidrogeniônico
Pi - fosfato inorgânico
pI - Ponto isoelétrico
PMSF - phenylmethanesulfonylfluoride
ppm - Parte por milhão
Q - Quadrupolo
RNA - Ácido ribonucléico
RP - Reverse phase (fase reversa)
rpm - Rotações por minuto
SAX - Strong Anion Exchange (Troca aniônica forte)
SCX - Strong Cation Exchange (Troca catiônica forte)
SDS - Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE - gel de poli(acrilamida) contendo dodecil sulfato de sódio
SEC - Size exclusion chromatography (Cromatografia por exclusão de tamanho)
TEMED - Tetrametiletilenodiamina
TFA - Ácido trifluoracético
TOF - Time-of-flight (Tempo de voo)
UniProt - Universal Protein Resource
UPLC-MS/MS - Cromatografia líquida de ultraperformance acoplada a espectrometria de massas
V - Volts
v/v - volume/volume
W - Watts
 α - alfa

Introdução

1 INTRODUÇÃO

1.1 CARACTERIZAÇÃO DA FLUOROSE DENTÁRIA

O Fluoreto (F^-) é um elemento comum na crosta terrestre. Está naturalmente presente em solos, rochas e águas e em altas concentrações em áreas com atividade piroclástica recente. O F^- foi introduzido na odontologia em meados da década de 40, e desde então desempenha um importante papel na odontologia. O seu uso disseminado contribuiu significativamente para a redução na prevalência e incidência da cárie dentária, sendo reconhecido mundialmente como uma das medidas de saúde pública mais importantes do século XX (American Dental Association, 2005; BUZALAF e LEVY, 2011). Entretanto, concomitantemente com o declínio da cárie dentária, tem sido observado um aumento da fluorose dentária (KHAN; MOOLA e CLEATON-JONES, 2005), um efeito colateral resultante da exposição prolongada ao F^- acima dos níveis recomendados durante o período de formação dentária, que para a dentição permanente vai desde o nascimento até aproximadamente 5 ou 6 anos de idade (BRONCKERS; LYARUU e DENBESTEN, 2009).

A fluorose dentária é caracterizada pela hipomineralização do esmalte dentário que ocorre durante o período de desenvolvimento deste tecido e sua severidade está diretamente relacionada a quantidade de F^- ingerida e ao tempo de exposição a este elemento (ANGMAR-MANSSON; ERICSSON e EKBERG, 1976; ANGMAR-MANSSON e WHITFORD, 1984; DENBESTEN e LI, 2011). Os primeiros sinais característicos da fluorose dentária são a mudança de coloração caracterizada pelo aparecimento de linhas horizontais brancas ao longo de toda superfície dentária, caracterizando uma fluorose de grau leve. Exposição a níveis mais elevados de F^- leva ao espessamento dessas linhas, fazendo com que toda a superfície dentária adquira a coloração branco opaca (fluorose moderada), e caso essa exposição perdure por longos períodos, as camadas mais profundas do esmalte são afetadas, podendo ainda haver fratura do esmalte, caracterizando uma fluorose severa (figura 1) (DENBESTEN e LI, 2011; MOLLER, 1982; SMITH, 1985).



Figura 1. Casos de fluorose dentária. Em **a** fluorose de grau leve; **b** fluorose moderada; **c** fluorose severa. Modificada de DENBESTEN e LI, 2011.

A patogênese e severidade da fluorose está relacionada às condições fisiológicas como crescimento ósseo, nutrição e função renal (EKSTRAND; SPAK e EHRNEBO, 1982; SPAK; BERG e EKSTRAND, 1985; WHITFORD, 1996) e mais recentemente tem sido incluída a susceptibilidade genética (EVERETT; MCHENRY; REYNOLDS et al., 2002). Os ossos constituem o maior reservatório de F^- no corpo humano, uma vez que este é incorporado na formação dos cristais de apatita. Assim, o rápido crescimento ósseo observado em crianças é capaz de depletar os níveis de F^- plasmáticos após exposição a este elemento. A nutrição por sua vez pode controlar os níveis plasmáticos, uma vez íons como cálcio, magnésio e alumínio podem reduzir a biodisponibilidade do F^- e a deficiência dos mesmos resultam no aumento da biodisponibilidade deste elemento (ANGMAR-MANSSON e WHITFORD, 1990; PENDRYIS e STAMM, 1990; TAVES, 1983; WHITFORD, 1996).

Mais recentemente tem-se sugerido que o *background* genético parece ter papel importante na severidade da fluorose dentária (CARVALHO; LEITE; YAN et al., 2009; EVERETT, 2011; EVERETT; MCHENRY; REYNOLDS et al., 2002; EVERETT; YAN; WEAVER et al., 2009; EVERETT; YIN; YAN et al., 2011). A evidência da existência de um componente genético para a susceptibilidade ao F^- vem do trabalho publicado por Everett e colaboradores em 2002 (EVERETT; MCHENRY; REYNOLDS et al., 2002), no qual os autores testaram 12 diferentes linhagens de camundongos: 129P3/J, A/J, BALB/cJ, C3H/HeJ, C57BL/6J, C57BL/10J, CBA/J, DBA1/J, DBA2/J, FVB/NJ, SJL/J e SWR/J. Os animais receberam água contendo F^- (25 ppm e 50 ppm) ou não (controle) por 60 dias. Os resultados mostraram que algumas linhagens de camundongos foram altamente suscetíveis ao F^- , apresentando maior grau de severidade de fluorose dentária, enquanto outras

se mostraram altamente resistentes. Deste modo, os camundongos foram agrupados em resistentes (129P3/J, FVB/NJ, CBA/J e DBA/1J), intermediários (SWR/J, BALB/cJ, C57BL/10J e DBA/2J) e susceptíveis (A/J, SJL/J, C3H/HeJ e C57BL/6J), sendo a mais resistente a linhagem 129P3/J e a mais susceptível a linhagem A/J.

Posteriormente, Carvalho e colaboradores (CARVALHO; LEITE; YAN et al., 2009) realizaram um estudo metabólico com as linhagens A/J (susceptível) e 129P3/J (resistente). Tal estudo revelou que os animais da linhagem 129P3/J retinham mais F^- no organismo que os animais da linhagem A/J, o que foi surpreendente, uma vez que mesmo apresentando níveis de F^- circulantes mais elevados, os animais da linhagem 129P3/J mostraram-se resistentes à fluorose dentária, que não se manifestou mesmo com a ingestão de água contendo 50 mg/L de F^- . A possibilidade da existência de um fator genético também foi investigada em humanos, onde um estudo revelou que polimorfismos do gene *Col1a2* podem estar correlacionados com o aparecimento da fluorose dentária em populações expostas ao F^- (HUANG; BA; CUI et al., 2008).

Mais recentemente, *loci* de características quantitativas (QTL) associados à fluorose dentária foram identificados nos cromossomos 2 e 11 dos camundongos A/J e 129P3/J, mas não no cromossomo X, onde se encontra a AMEL, o que sugere um papel pequeno desta proteína na susceptibilidade/resistência à fluorose dentária (EVERETT; YAN; WEAVER et al., 2009; EVERETT; YIN; YAN et al., 2011), 2009).

1.2 AMELOGÊNESE E OS EFEITOS DO FLUORETO NOS AMELOBLASTOS

A estrutura dentária é composta por três diferentes tecidos mineralizados: o cimento, a dentina e o esmalte. O cimento é encontrado ao longo de toda a raiz e sua principal função é fornecer um meio de inserção das fibras colágenas que mantêm o dente fixo ao osso alveolar da mandíbula e maxila. A dentina, que compõe a maior parte do dente, possui uma composição semelhante à do tecido ósseo, sendo mais dura que este e mais macia que o esmalte e sua principal

função é proteger a polpa dentária. Por apresentar uma certa elasticidade, impede que haja fraturas do esmalte dentário. E, por fim, a camada do esmalte, que recobre toda coroa do dente e é a substância mais dura do corpo (NANCI, 2012).

O esmalte é translúcido e de cor variando entre os tons amarelo-claro e branco-acinzentado. Sua espessura é de aproximadamente 2,5 mm e quando completamente formado sua composição é 96% mineral em volume (cristais de cálcio e fosfato), sendo essa alta quantidade de mineral fator responsável pela alta dureza do esmalte e 4% em volume de material orgânico e água (figura 2).

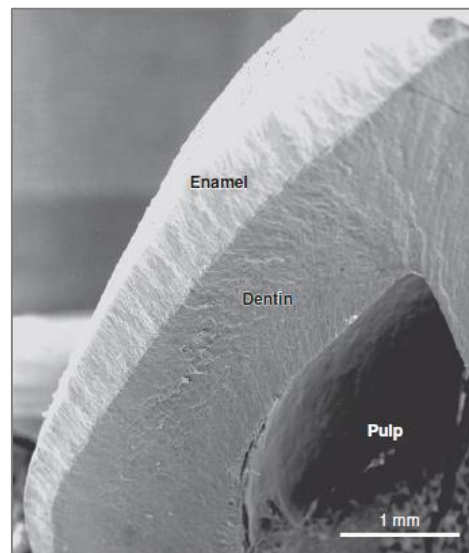


Figura 2. Microscopia eletrônica de varredura mostrando a camada do esmalte sobre a dentina (NANCI, 2012).

A amelogênese, como é conhecida a formação do esmalte dentário, é um processo complexo que envolve a proliferação e diferenciação celular através de interações epitélio-mesenquimais sequenciais, secreção de proteínas de matriz esmalte, transporte de íons, incluindo cálcio e F^- , e precipitação e alinhamento dos cristais do esmalte através de interações entre moléculas orgânicas e inorgânicas (AOBA e FEJERSKOV, 2002). Basicamente a amelogênese é dividida

em 3 estágios funcionais referenciados como estágio de pré-secreção, secreção e maturação, discutidos abaixo e sumarizados na figura 3 (NANCI, 2012).

A dinâmica do processo de biomineralização do esmalte se inicia com a degradação da membrana basal, permitindo o contato direto entre os odontoblastos, células responsáveis pela produção da dentina, e os pré-ameloblastos. Essa fase é chamada de *pré-secretora* é caracterizada pela presença de células derivadas do epitélio interno do esmalte denominadas pré-ameloblastos, os quais durante esta fase, passam por transformações morfológicas, alongando-se, polarizando seu núcleo e aumentam a capacidade de síntese proteica, transformando-se em ameloblastos secretores (MORADIAN-OLDAK, 2012; NANCI, 2012).

Na fase *secretora*, os ameloblastos são vistos como células epiteliais colunares, que secretam e depositam as proteínas da matriz a qual, por sua vez, servirá como um arcabouço para a deposição inicial de uma fina camada de esmalte aprismático, e portanto, é nessa etapa que a espessura do esmalte é definida. Alguns estudos relataram que a exposição ao F⁻ nesta fase é capaz alterar a morfologia dos ameloblastos e aumentar o número de vacúolos na borda apical, que pode levar a uma redução na síntese da matriz e conseqüentemente a uma diminuição na deposição da matriz (AOBA; MORENO; TANABE et al., 1990; BRONCKERS e WOLTGENS, 1985; DEN BESTEN, 1986). Há relatos de que a exposição crônica ao F⁻ leva à redução da espessura da camada de esmalte em aproximadamente 10% (ASHRAFI; EISENMANN; ZAKI et al., 1988; BRONCKERS; LYARUU; BERVOETS et al., 2002; MATSUO; INAI; KURISU et al., 1996; MONSOUR; HARBROW e WARSHAWSKY, 1989), bem como pode levar ao aumento do apoptose celular (KUBOTA; LEE; TSUCHIYA et al., 2005).

A fase de *transição* ou *secreção tardia* ocorre entre a fase de secreção e maturação, quando a célula se torna menor e tem sua atividade secretora drasticamente reduzida, devido à perda da maior parte das organelas envolvidas na síntese de proteínas pelos ameloblastos, que passam a apresentar uma morfologia semelhante à de uma célula epitelial. Logo se inicia a fase de *maturação*, que é marcada por uma modulação cíclica dos ameloblastos que alternam sua borda apical entre terminação lisa e terminação rugosa. Esta

alternância lisa/rugosa da borda apical é responsável pela completa remoção de água e conteúdo proteico bem como pelo aumento gradual da mineralização do esmalte, através do controle de transporte de íons (cálcio, fosfato e bicarbonato), endocitose e pH (DENBESTEN e LI, 2011; NANJI, 2012; WARSHAWSKY e SMITH, 1974).

Estudos indicam que a fase de maturação parece ser a mais susceptível aos efeitos do F^- , uma vez que este leva à interrupção da modulação cíclica dos ameloblastos (DENBESTEN; CRENSHAW e WILSON, 1985; SMITH; NANJI e DENBESTEN, 1993). A primeira modulação que desaparece durante a exposição ao F^- é a de borda lisa nos ameloblastos da porção mais incisal, e conforme a exposição se prolonga, elas continuam a desaparecer até a porção apical. Essas alterações na modulação levam à redução na incorporação cíclica de cálcio e também são correlacionadas com a retenção de proteínas. Entretanto, com a interrupção da exposição ao F^- , há o reaparecimento das bordas lisas, iniciando da porção mais apical (mais jovens) para a porção mais incisal (mais velhos), indicando que os efeitos na modulação são reversíveis e que células mais jovens se recuperam mais rapidamente (DENBESTEN; CRENSHAW e WILSON, 1985).

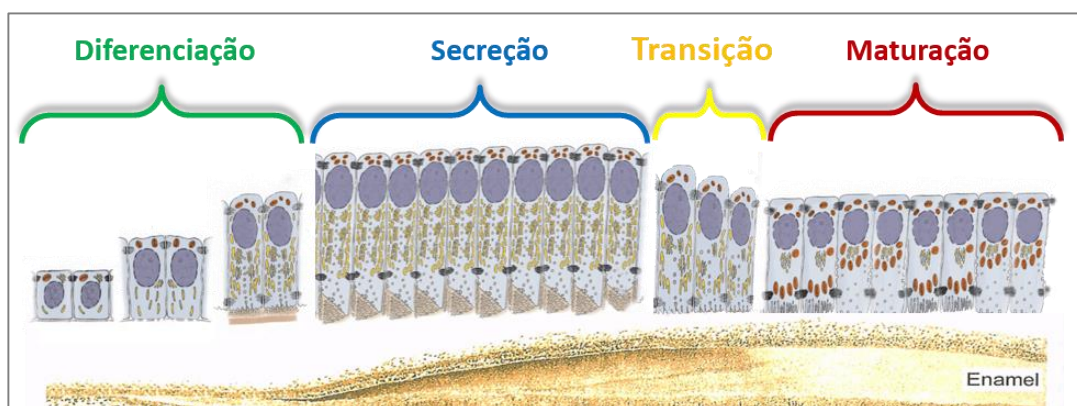


Figura 3. Representação esquemática das diferentes etapas funcionais no ciclo de vida de ameloblastos durante a amelogênese em incisivos de roedores (figura elaborada pelo autor).

1.3 PROTEÍNAS DA MATRIZ DO ESMALTE

Na década de 60, foi demonstrado que o esmalte em desenvolvimento apresentava um alto conteúdo proteico mas, quando maduro, esse conteúdo orgânico desaparecia (EASTOE, 1963). Assim, dois pontos importantes merecem ser destacados sobre as proteínas da matriz do esmalte: o primeiro é que elas são necessárias ao desenvolvimento adequado do esmalte dentário; e o segundo, é a necessidade da remoção das mesmas, uma vez que, apesar de serem necessárias à formação do esmalte, não são parte do produto final. A matriz orgânica do esmalte é composta por proteínas estruturais (as amelogeninas, enamelin, amelotina e ameloblastina) e proteinases (metaloproteinase 20 e calicreína 4) (BARTLETT, 2013; FINCHAM; MORADIAN-OLDAK e SIMMER, 1999; MORADIAN-OLDAK, 2012).

As amelogeninas formam o grupo mais abundante (>90%) de proteínas que compõem a matriz orgânica do esmalte, e são essenciais para a formação do esmalte, como demonstrado através da engenharia genética de camundongos nulos para amelogenina (GIBSON; YUAN; HALL et al., 2001; HART; HART; SIMMER et al., 2002; KIM; SIMMER; HU et al., 2004; WRIGHT; HART; ALDRED et al., 2003). Em humanos, o gene da amelogenina (*AMELX* ou *AMELY*) contém 7 éxons e está localizado nos cromossomos X e Y, enquanto que em roedores tal gene localiza-se apenas no cromossomo X (*Amelx*) e possui 9 éxons (CHAPMAN; KEITZ; DISTECHE et al., 1991; LAU; MOHANDAS; SHAPIRO et al., 1989; SNEAD; ZEICHNER-DAVID; CHANDRA et al., 1983).

A amelogenina apresenta apenas uma modificação pós-traducional, uma fosforilação em um único resíduo (Ser 16), entretanto, o seu transcrito primário sofre diversos processamentos alternativos (*alternative splicing*) gerando pelo menos 16 mRNAs (BABA; TAKAHASHI; TERASHIMA et al., 2002; BARTLETT; BALL; KAWAI et al., 2006; FINCHAM e MORADIAN-OLDAK, 1995; GIBSON; GOLUB; DING et al., 1991; LAU; SIMMER; BRINGAS et al., 1992; SALIDO; YEN; KOPRIVNIKAR et al., 1992; TAKAGI; SUZUKI; BABA et al., 1984). Esses transcritos separadamente codificam as proteínas M180 (*Mouse 180 amino acid amelogenin protein*) e LRAP (*Leucine-rich amelogenin peptide*). Estudos recentes com animais nulos

para amelogenina e técnica de transgene envolvendo essas duas proteínas, demonstraram que a M180 aumentou a espessura e melhorou o padrão de prismas do esmalte, ao passo que a LRAP não apresentou tais melhoras. Porém, quando as duas foram expressas no mesmo animal, o aumento da espessura e estrutura dos prismas foram bem maiores que aqueles observados para o M180 apenas (GIBSON; LI; SUGGS et al., 2011). Portanto, embora a razão para os processamentos alternativos dos transcritos da amelogenina permaneça desconhecida, eles parecem contribuir para a formação adequada do padrão prismático do esmalte.

Suas porções N-terminal e C-terminal são altamente conservadas entre os mamíferos, indicando um papel crítico desses resíduos (SIRE; DELGADO; FROMENTIN et al., 2005). Sua sequência apresenta uma porção hidrofóbica mais central rica em prolina, histidina e glicina. A porção N-terminal é rica em tirosina e a região C-terminal é altamente carregada (pI 4,2), embora o pI da proteína seja 8,0 (BARTLETT; SKOBE; NANJI et al., 2011; HU; CHUN; AL HAZZAZZI et al., 2007; SIMMER; HU; LERTLAM et al., 2009).

Há uma dificuldade em se determinar sua estrutura secundária devido a fenômenos de autoassociação ou agregação, e a instabilidade intrínseca desta proteína, uma vez que a estrutura da amelogenina é enriquecida em prolina e glicina, aminoácidos conhecidos por promover a desordem estrutural de proteínas (KATZ; SEYER; LEVINE et al., 1969; LAKSHMINARAYANAN; YOON; HEGDE et al., 2009; MECHANIC; KATZ e GLIMCHER, 1967; MORADIAN-OLDAK e LAKSHMINARAYANAN, 2010). Apesar da natureza desdobrada da amelogenina, a presença de locais de estrutura secundária (alfa-hélice, folhas beta, *loops*, e hélice de poliprolina) foram detectados (DELAK; HARCUP; LAKSHMINARAYANAN et al., 2009).

Com relação ao seu papel na biomineralização do esmalte, acredita-se que a amelogenina não seja necessária para o início da mineralização, mas é essencial para o crescimento dos cristais de esmalte, bem como para alcançar a espessura ideal deste. Tal observação foi obtida através de estudos *in vivo* com animais nulos para amelogenina. Os dentes destes animais apresentavam uma coloração branco-opaco, e um esmalte aprismático e fino (10-20% da

espessura normal) (figura 4) (GIBSON; YUAN; HALL et al., 2001; WRIGHT; LI; SUGGS et al., 2011).

A ameloblastina é a segunda proteína mais abundante na matriz do esmalte e foi inicialmente descrita como uma proteína de esmalte de porco que migrava entre 13 KDa e 17 KDa no SDS-PAGE (FUKAE e TANABE, 1987). Em humanos, seu gene está localizado no cromossomo 4 e possui 13 éxons e mutações nesse gene resultam em uma amelogênese imperfeita severa. Possui um domínio de 86 aminoácidos, que é altamente conservado entre as espécies, e estudos de imunolocalização mostraram que os produtos clivados desta proteína acumulam-se na bainha prismática, enquanto que a ameloblastina intacta é acumulada mais externamente no esmalte recém-formado (MURAKAMI; DOHI; FUKAE et al., 1997; UCHIDA; MURAKAMI; DOHI et al., 1997). Este foi o primeiro indício de que a ameloblastina intacta e os produtos clivados desempenham funções diferentes na biomineralização do esmalte.

Trata-se de uma glicoproteína que possui em sua estrutura alto conteúdo de prolina (15,2%), leucina (10,2%) e glicina (9%), além de apresentar resíduos fosforilados e hidroxiprolina (YAMAKOSHI; TANABE; OIDA et al., 2001). Interessantemente, sua estrutura possui uma natureza bipolar, onde um domínio N-terminal de 129 aminoácidos (aa) apresenta pI de 10,6 e o C-terminal de 66 aminoácidos tem pI 4,5. Esses dois domínios são conectados por uma região não estruturada susceptível a proteólise (VYMETAL; SLABY; SPAHR et al., 2008).

Originalmente, o modelo de camundongo nulo para a ameloblastina apresentava apenas os éxons 5 e 6 deletados, porém, subsequentemente descobriu-se que mesmo após a remoção destes, um mRNA truncado era expresso e posteriormente traduzido. Como consequência, uma fina camada de material desprovido de cristais prismáticos e que não se assemelhava ao esmalte era produzida (figura 4) (FUKUMOTO; KIBA; HALL et al., 2004; WAZEN; MOFFATT; ZALZAL et al., 2009). Notou-se ainda que nesses animais nulo, os ameloblastos eram normalmente arranjados e iniciavam o processo de alongação para passar ao estágio secretor. Entretanto, após o início da fase secretora, esses mesmos ameloblastos anormalmente se distanciavam da matriz, perdiam sua polaridade celular e se dobravam uns sobre os outros, e,

baseado nesses achados, sugere-se que a ameloblastina desempenha um importante papel na adesão celular (FUKUMOTO; KIBA; HALL et al., 2004).

A enamelina é expressa durante os três principais estágios de formação do esmalte e, ao contrário da amelogenina, é de natureza hidrofílica e muito menos abundante. Assim como a ameloblastina, seu gene está localizado no cromossomo 4 em humanos, e possui 9 éxons. Estudos com esmalte proveniente de suínos revelaram que esta proteína é inicialmente secretada como uma glicoproteína fosforilada de 186 kDa, mas logo após ser secretada é clivada resultando em três produtos de 155, 142 e 89 kDa. Este último é posteriormente clivado gerando dois novos produtos de 32 e 25 kDa, sendo o produto de 32 kDa (aa 136-241) altamente conservado entre as espécies, sugerindo um importante papel funcional deste fragmento na formação do esmalte (AL-HASHIMI; SIRE e DELGADO, 2009; FUKAE; TANABE; MURAKAMI et al., 1996; FUKAE; TANABE; UCHIDA et al., 1993; HU; FUKAE; UCHIDA et al., 1997; HU; HART; DUPONT et al., 2000). Embora a enamelina seja produzida em quantidade muito mais inferior a amelogenina, estudos com animais nulos (*Enam*^{-/-}) mostraram a ausência da camada de esmalte (figura 4) indicando que esta proteína, assim como a ameloblastina, desempenha um papel crítico na iniciação da mineralização do esmalte (HU; HU; SMITH et al., 2008; MASUYA; SHIMIZU; SEZUTSU et al., 2005; SEEDORF; KLAFTEN; EKE et al., 2007).

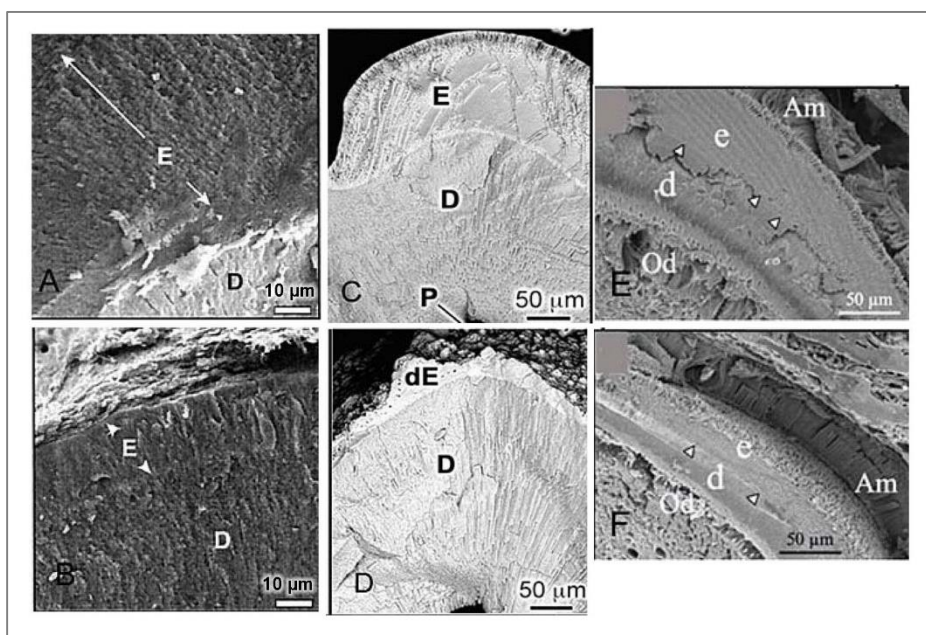


Figura 4. MEV de incisivos fraturados mostrando os defeitos de formação no esmalte. (A) Camundongo wild type. (B) Esmalte de camundongo nulo para Amel. Não apresenta estrutura prismática normal e sua espessura é notoriamente reduzida em comparação com wild type (GIBSON; YUAN; HALL et al., 2001). Camundongos Heterozigoto +/- para Ambn (C) e Homozigoto -/- para Ambn (D). Observa-se em D uma camada com grande displasia e superfície rugosa sobre a dentina, bem como ausência total de padrão prismático (FUKUMOTO; KIBA; HALL et al., 2004). Em (E) Heterozigoto +/- para Enam e (F) Homozigoto -/- para Enam. Nota-se que o esmalte formado em F não é mineralizado, mas apresenta uma grande semelhança com a matriz do esmalte (FUKAE; TANABE; UCHIDA et al., 1993). E: esmalte, D: dentina, dE: esmalte defeituoso, AM: Ameloblastos, Od: Odontoblastos; pontas de seta em E e F indicam a junção amelodentinária

Mais recentemente, foi descoberta uma nova proteína na matriz orgânica do esmalte, a Amelotina (IWASAKI; BAJENOVA; SOMOGYI-GANSS et al., 2005). Originalmente foi descrita como uma glicoproteína secretada pelos ameloblastos no estágio de maturação como um componente da lâmina basal, entre os ameloblastos e a matriz do esmalte. Entretanto, estudos recentes revelaram sua presença também no estágio de secreção. Seu gene se localiza no cromossomo 5 e possui 9 éxons, e a presença de processamento alternativo também foi detectada. Seu pico de expressão acontece na zona de transição ente a fase de secreção e maturação, mas sua função ainda não está clara (GAO; WANG; SUN

et al., 2010; IWASAKI; BAJENOVA; SOMOGYI-GANSS et al., 2005; MOFFATT; SMITH; ST-ARNAUD et al., 2006).

Além das proteínas estruturais acima citadas, há a presença de duas proteinases, cuja função é processar e degradar as proteínas da matriz orgânica do esmalte. A metaloproteinase de matriz 20 (MMP20), também conhecida como enamelinase, parece ser a única MMP de ação exclusiva dos tecidos dentários, além de ser expressa por células com diferentes origens embrionárias, epitelial (ameloblastos) e mesenquimal (odontoblastos) (BARTLETT; SIMMER; XUE et al., 1996; FUKAE e TANABE, 1998). Seu gene está localizado no cromossomo 11 e possui 10 éxons. Duas bandas, uma de 46 KDa e a outra de 41 KDa, são visualizadas em imunomarcações e zimogramas, e acreditava-se inicialmente que a banda superior seria a pró-enzima e a mais baixa a enzima ativada. Porém, experimentos revelaram que mesmo após exposição a condições oxidantes e redutoras, ambas as bandas continuavam a serem detectadas em condições oxidantes, e após oxidação a banda de 41 kDa era substituída por uma banda de 27 KDa. Surpreendentemente, sequenciamento de *Edman* revelou que as três bandas continham o fragmento (YRLFPGEPK) na extremidade N-terminal, e que, portanto, nenhuma das três bandas correspondiam ao zimogênio da MMP20 (FUKAE; TANABE; UCHIDA et al., 1998; YAMADA; YAMAKOSHI; GERLACH et al., 2003).

De maneira geral, a MMP20 atua no esmalte clivando as proteínas da matriz em sítios específicos, produzindo produtos intermediários estáveis durante o estágio de secreção. Aparentemente, esses produtos intermediários irão desencadear a transformação dos cristais amorfos de fosfato de cálcio em hidroxiapatita mineralizada (KWAK; WIEDEMANN-BIDLACK; BENIASH et al., 2009; NAGANO; KAKEGAWA; YAMAKOSHI et al., 2009; RYU; FINCHAM; HU et al., 1999; SUN; FAN; FAN et al., 2008). Sua atividade é afetada pelo aparecimento dos cristais de apatita, reduzindo a taxa de proteólise da amelogenina (USKOKOVIC; KIM; LI et al., 2008). Camundongos nulos para MMP20 exibem um esmalte hipoplásico, com apenas 1/3 do conteúdo mineral existente em animais selvagens, com padrão prismático desorganizado (BARTLETT; BENIASH; LEE et al., 2004; CATERINA; SKOBE; SHI et al., 2002; SMITH; RICHARDSON; HU et al., 2011). Além disso, a

MMP20 cliva o pró-peptídeo da calicreína-4 (KLK4) para produzir a forma ativa da KLK4 (RYU; HU; YAMAKOSHI et al., 2002).

A calicreína 4 (KLK4) é uma protease expressa do início da fase de transição até o fim da maturação, cuja função principal é digerir os produtos proteolíticos resultantes da proteólise pela MMP20. A primeira evidência que suporta essa tese é que, diferentemente da MMP20, a KLK4 não tem sua atividade significativamente afetada pelos cristais de apatita. Além disso, a enamelinina 32 KDa é resistente à ação da MMP20, mas não da KLK4 (BARTLETT, 2013; SUN; CARPIAUX; FAN et al., 2010; YAMAKOSHI; HU; FUKAE et al., 2006). Camundongos nulos para KLK4 apresentam esmalte com espessura normal e estrutura prismática típica, mas há um atraso no endurecimento, bem como mineralização defeituosa na junção amelodentinária (DEJ). Esse fenótipo menos severo que aquele observado para MMP20 sugere a existência de uma terceira enzima (SIMMER; HU; LERTLAM et al., 2009; SMITH; RICHARDSON; HU et al., 2011). Recentemente foi relatado que a MMP9 está envolvida no processamento da Amelogenina. Esse trabalho foi desenvolvido com camundongos nulos para MMP9, mas os autores falharam em mostrar o fenótipo do esmalte desses camundongos (FENG; MCDANIEL; CHUANG et al., 2012). Níveis de expressão aumentada da Calderina-c (CTRC) também foram recentemente detectados durante o estágio de maturação, indicando um possível papel desta proteína na mineralização do esmalte (LACRUZ; SMITH; SMITH et al., 2011).

1.4 ANÁLISE PROTEÔMICA

Em 2001, a capa das duas maiores revistas científicas do mundo, *Nature* e *Science*, traziam como tema a decifração do genoma humano. O sequenciamento do genoma humano foi iniciado como uma esperança de compreender melhor, não só os mecanismos moleculares envolvidos nas funções fisiológicas, mas principalmente para entender os mecanismos envolvidos no surgimento de doenças como por exemplo o câncer. Porém, ao término do sequenciamento genômico, ficou evidente que apenas com as

sequências de nucleotídeos presentes no DNA não seria possível elucidar todos os processos biológicos.

O termo PROTEOMA foi introduzido pela primeira vez em 1995 por Marc Wilkins para se referir ao conjunto de PROTEÍNAS expressas por um determinado genOMA. As proteínas são as unidades funcionais de um organismo e suas atividades específicas, estado de modificação, associação com outras biomoléculas e os níveis de expressão são essenciais para determinação dos estados fisiológicos ou patológicos dos sistemas biológicos. Deste modo, torna-se impossível elucidar os diversos mecanismos que interagem em um determinado organismo apenas pelo estudo dos genes. Em virtude disto, surgiu uma nova abordagem experimental na Biologia conhecida como análise proteômica, que consiste de um conjunto de ferramentas empregadas para caracterizar (quali e quantitativamente) um conjunto de proteínas expressas por um dado genoma (WILKINS; SANCHEZ; GOOLEY et al., 1996).

O proteoma apresenta uma natureza altamente dinâmica e complexa, que é resultado das inúmeras modificações pós-traducionais, interações moleculares, e dos diversos processamentos alternativos do mRNA, razão pela qual a expressão de mRNA pode não ser correlacionada com o teor de proteínas (ROGERS; GIROLAMI; KOLCH et al., 2008). Assim, uma das diferenças mais significativas entre o transcriptoma e o proteoma é a faixa dinâmica de concentração (*dynamic range*). Enquanto que a abundância das proteínas se estende por pelo menos sete ordens de magnitude, isto é, de 1 a 10 milhões de cópias por célula, a dinâmica de concentração para mRNA abrange apenas três ou quatro ordens de magnitude (SCHWANHAUSSER; BUSSE; LI et al., 2011). Essa faixa de concentração dinâmica do proteoma é representada por uma curva quase simétrica em escala logarítmica (figura 5). Por causa dessa simetria, pode-se dividir a curva em duas metades aproximadamente iguais, e para cada ordem de aumento de magnitude na sensibilidade do equipamento ou tamanho da amostra, maior é o número de proteínas detectadas. No entanto, quando cerca de metade do proteoma é detectado, a inclinação da curva se inverte, pois o aumento da magnitude agora resulta num menor incremento no número de

proteínas (SHANKARANARAYANAN; MENDOZA-PARRA; VAN GOOL et al., 2012; ZUBAREV, 2013).

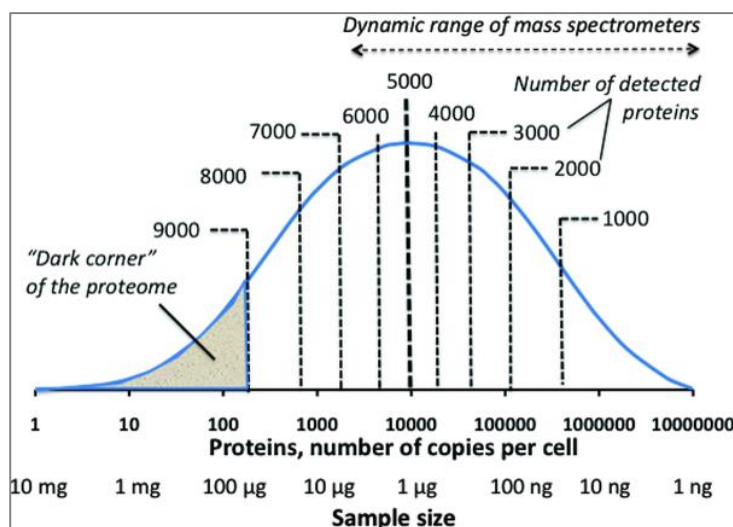


Figura 5. Distribuição da abundância de proteína em escala logarítmica do número de cópias por célula. A análise proteômica convencional detecta proteínas altamente abundantes, e se estende por cerca de quatro ordens de grandeza. Conforme o número de cópias diminui, maior deve ser o tamanho da amostra. O "canto escuro" representa o maior desafio para o proteoma (ZUBAREV, 2013).

Quando se inicia uma análise proteômica, em princípio não se conhecem as proteínas e peptídeos que estarão presentes na amostra e, além disso, deve-se pensar na faixa dinâmica de concentração deste complexo proteico. Portanto, o fracionamento ou separação das proteínas é um passo importante e crítico desta abordagem, e nesse sentido, a combinação de métodos sequenciais que exploram diferentes propriedades das proteínas fornecem uma análise mais precisa das misturas proteicas. As estratégias analíticas mais utilizadas são a Eletroforese Bidimensional em Gel de Poliacrilamida (2D-PAGE) e Cromatografia Líquida Multidimensional (MDLC), ambas associadas à espectrometria de massas (DOUCETTE; TRAN; WALL et al., 2011; SALVATO; CARVALHO e LEITE, 2012).

A 2D-PAGE foi inicialmente desenvolvida independentemente por O'Farrell e Klose (KLOSE, 1975; O'FARRELL, 1975). Trata-se de uma técnica de

separação amplamente utilizada para a análise de misturas proteicas complexas provenientes de células, tecidos ou fluidos biológicos, que promove a separação das proteínas em duas dimensões, de acordo com duas propriedades independentes. Na primeira dimensão, conhecida como focalização isoelétrica (IEF), as proteínas são separadas de acordo com seus pontos isoelétricos (pI). Como sabido, as proteínas são moléculas anfóteras, ou seja, podem apresentar carga líquida positiva, negativa ou neutra, dependendo de sua estrutura primária (dos aminoácidos que a compõe) e do pH do meio. Assim, durante a IEF, as proteínas são submetidas a gradiente de pH em tiras de gel, e sob a influência de um campo elétrico, estas migram para a posição do gradiente na qual sua carga líquida será zero, focalizando-se neste ponto, onde o valor de pH é numericamente igual ao pI (NELSON e COX, 2002). Já na segunda dimensão, as tiras contendo as proteínas focalizadas são transferidas para um gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) e subsequentemente separadas de acordo suas massas moleculares (MM) relativas (Figura 6)(WESTERMEIER e NAVEN, 2002). Após a realização da eletroforese, o gel deve ser corado para visualização das proteínas, podendo-se utilizar corantes orgânicos como o Azul de *Coomassie* (CANDIANO; BRUSCHI; MUSANTE et al., 2004) ou a coloração por prata (REINDERS e SICKMANN, 2002). Após a coloração, os géis são digitalizados e analisados com *softwares* específicos que determinam os *spots*, identificam aqueles diferencialmente expressos e seus volumes, inferindo uma quantificação relativa da expressão daquela proteína em comparação ao mesmo *spot* de outro gel. Os *spots* de interesse são então removidos dos géis e submetidos à análise por espectrometria de massas para identificação da(s) proteína(s).

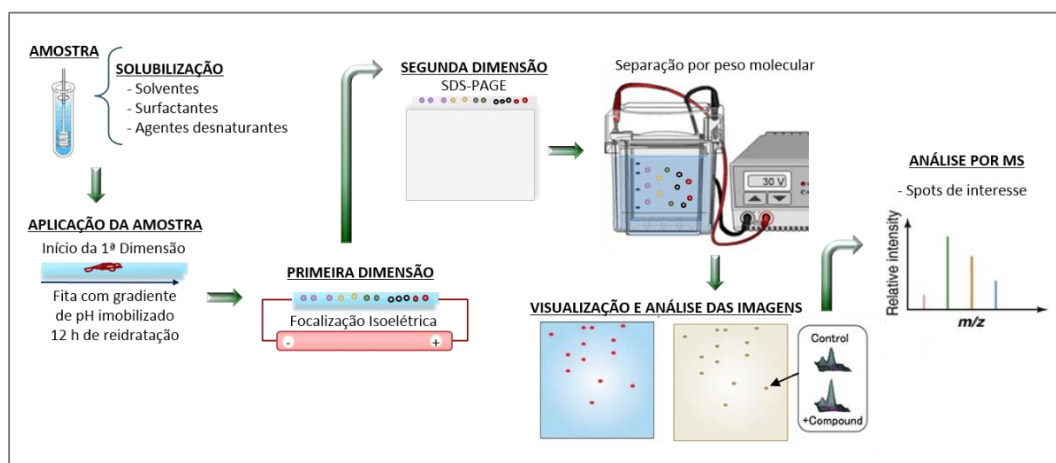


Figura 6. Etapas envolvidas no processo de separação de proteínas por eletroforese bidimensional (LEITE, 2010).

Outra estratégia que vem ganhando bastante destaque é a abordagem denominada “*shotgun*”, um método de identificação de proteínas em misturas complexas que utiliza a combinação da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em nano-escala (nHPLC) com espectrometria de massas em tandem (MS/MS). Nessa abordagem, as proteínas presentes em uma mistura são digeridas com uma enzima, normalmente tripsina e os peptídeos resultantes são separados e analisados por nHPLC-MS/MS. As principais vantagens dessa técnica em relação à 2D-PAGE são principalmente a automação, melhor sensibilidade e aumento da cobertura do proteoma (LINK; ENG; SCHIELTZ et al., 1999; WOLTERS; WASHBURN e YATES, 2001; YATES, 2004).

Mais recentemente tem sido adotada a Cromatografia Líquida Multidimensional (MDLC), onde as amostras são submetidas a separações cromatográficas sequenciais, utilizando diferentes propriedades químicas ou físicas das proteínas. A MDLC foi originalmente descrita por Giddings, em 1984 (GIDDINGS, 1984) como uma técnica que combina dois ou mais tipos de LC para aumentar a capacidade de seletividade e resolução dos picos, melhorando assim o fracionamento dos peptídeos que serão analisados por MS. Métodos que combinam cromatografia de troca catiônica forte (SCX–*Strong Cation Exchange*), troca aniônica forte (SAX–*Strong Anion Exchange*), exclusão de tamanho (SEC–*Size exclusion*), cromatografia de afinidade (AC–*Affinity*

Chromatography) e a cromatografia líquida de fase reversa vêm sendo bastante utilizados em abordagens proteômicas (HYNEK; SVENSSON; JENSEN et al., 2006; MORITZ; CLIPPINGDALE; KAPP et al., 2005; ZHANG; XU; GAO et al., 2007).

Alguns fatores devem ser ponderados quando se considera uma abordagem MDLC. A primeira dimensão deve ter uma grande capacidade de carga, pois é nesta fase que todas as proteínas são injetadas, e ser compatível com a segunda dimensão, ou seja, apresentar compatibilidade com os solventes subsequentes, porém caso não haja a possibilidade de compatibilidade, pode-se optar por métodos *off-line*. Além disso, a última dimensão geralmente é interligada diretamente a um MS, e frequentemente é de fase reversa (RP), pois além de fornecer alto poder de resolução dos picos peptídicos, promove uma dessalinização eficaz das amostras, e a fase móvel apresenta compatibilidade com ionização por *eletrospray* (ESI), método de ionização mais utilizado nessa abordagem. A figura 7 esquematiza um exemplo da abordagem MDLC.

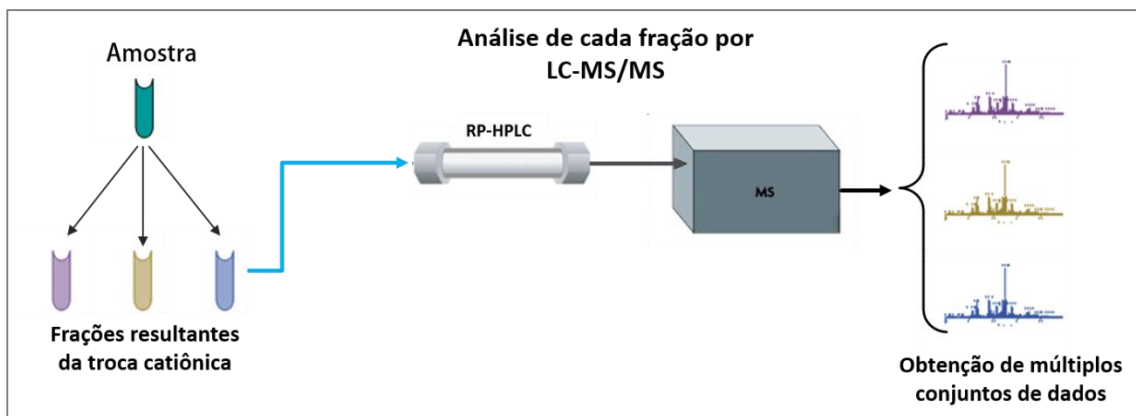


Figura 7. Representação esquemática de uma Cromatografia Líquida Multidimensional (MDLC) associada a espectrometria de massas.

Uma poderosa ferramenta associada à abordagem proteômica é a Espectrometria de Massas (EM), pois possui extrema capacidade para identificar e, cada vez mais, para quantificar de forma precisa milhares de proteínas em amostras complexas. Um espectrômetro de massas (MS) é um instrumento analítico capaz de medir a razão massa-carga (m/z) de uma ou mais moléculas

presentes numa determinada amostra. Por definição, um MS é constituído por uma fonte de ionização, um analisador de massas, que mede a relação massa-carga (m/z) dos analitos ionizados, e um detector, que registra o número de íons para cada valor de m/z (AEBERSOLD e MANN, 2003; DASS, 2007).

As fontes de ionização mais comumente utilizadas são a Ionização por *Eletrospray* (ESI) e Ionização por Dessorção a Laser Assistida por Matriz (MALDI). Na ESI a amostra é misturada a uma solução volátil e levemente ácida, e bombeada por cromatografia líquida através de um tubo capilar metálico, no qual é aplicada uma voltagem (3 a 4 kV). Esse procedimento gera um *spray* contendo microgotas de molécula e solvente altamente carregadas, que são subsequentemente evaporadas até que reste apenas o analito ionizado. O princípio da técnica MALDI baseia-se em misturar a amostra com uma matriz (ácido 2,5-dihidroxibenzóico ou ácido α -cyano-4-hidroxicinâmico), sobre a qual é incidido um feixe de laser. A matriz é capaz de absorver a energia do laser e transferir para a molécula de interesse, resultando na evaporação e ionização da amostra. MALDI-MS é normalmente utilizado para analisar as misturas de peptídeos relativamente simples, enquanto que para amostras complexas, ESI-MS são preferidos (AEBERSOLD e GOODLETT, 2001; AEBERSOLD e MANN, 2003; FENN; MANN; MENG et al., 1989; KARAS e HILLENKAMP, 1988; MANN; HENDRICKSON e PANDEY, 2001; PANDEY e MANN, 2000).

O analisador de massa é indubitavelmente o coração desta tecnologia. No contexto da proteômica os principais parâmetros são a sensibilidade, resolução, acurácia de massa e a capacidade de gerar espectros de massa ricos em informações a partir de fragmentos peptídicos. Em proteômica, quatro analisadores se destacam: *íon trap* (IT), *time-of-flight* (TOF), quadrupolo (Q) e transformada de Fourier (FT). Eles são muito diferentes em desempenho, cada um com suas próprias vantagens e desvantagens, e podem atuar de forma autônoma ou, em alguns casos, em conjunto, resultando em equipamentos híbridos, a fim de aproveitar os pontos fortes de cada um (AEBERSOLD e GOODLETT, 2001; AEBERSOLD e MANN, 2003; CANAS; LOPEZ-FERRER; RAMOS-FERNANDEZ et al., 2006; DASS, 2007; MANN; HENDRICKSON e PANDEY, 2001). A figura 8 ilustra os tipos de MS mais utilizados em proteômica.

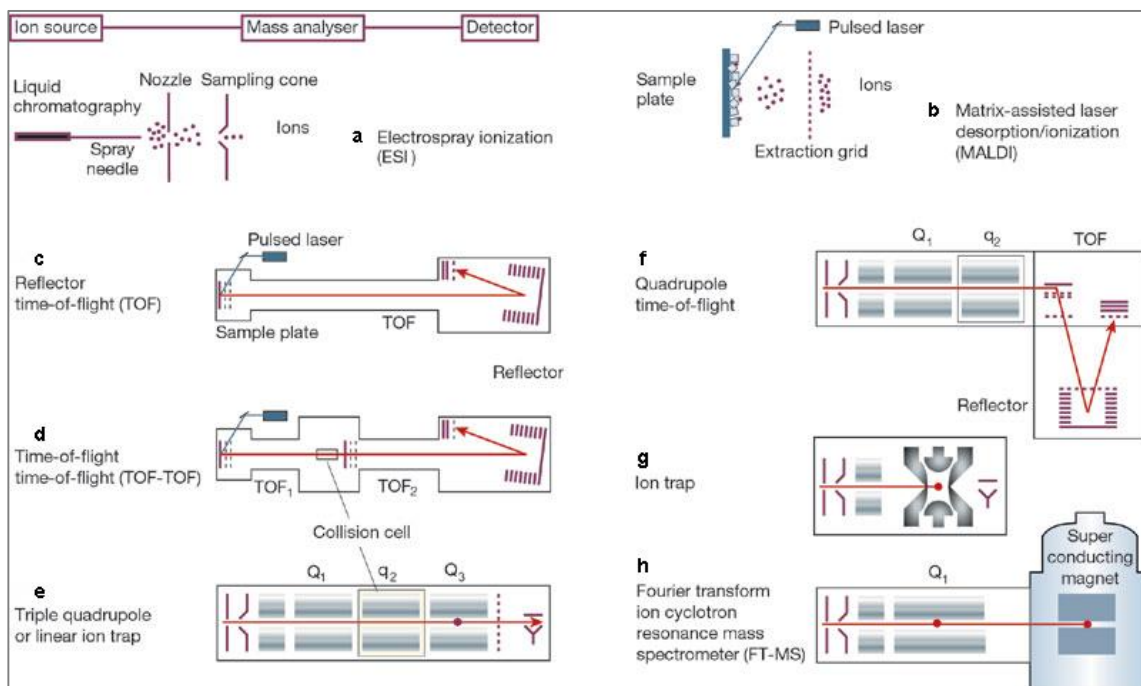


Figura 8. Os diferentes processos de ionização da amostra (a e b), bem como as diferentes configurações dos analisadores de massas utilizados (c, d, e, f, g e h) (AEBERSOLD e MANN, 2003).

Como descrito previamente, diversas proteínas interagem durante a amelogênese, entretanto, o perfil global da matriz orgânica do esmalte nunca foi observado através de metodologias que permitem o estudo das proteínas em larga escala. Neste sentido, a análise proteômica emerge como uma importante ferramenta pois, o conhecimento de todas as proteínas que compõem a matriz do esmalte pode trazer novas perspectivas sobre os mecanismos envolvidos na patogênese da fluorose dentária, uma vez que não há na literatura trabalhos que avaliem o perfil global de proteínas no esmalte dentário.

Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

O objetivo geral deste trabalho é avaliar o perfil proteômico do esmalte proveniente das linhagens de camundongos A/J e 129P3/J.

2.2 ESPECÍFICOS

- Caracterizar o perfil proteômico do esmalte proveniente das fases de secreção e maturação, através das técnicas de eletroforese bidimensional e cromatografia líquida de ultra performance associadas à espectrometria de massas;
- Analisar *in silico* as proteínas identificadas no que diz respeito às suas funções biológicas e possíveis interações proteicas através de *protein-protein interaction database*.

Material & Métodos

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 OBTENÇÃO DOS ANIMAIS E COLETA DE AMOSTRAS

Este projeto foi submetido à aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo (FOB-USP), tendo sido aprovado (Proc. 08/2011) (Anexo A).

Foram utilizados um total de 64 camundongos machos de 21 dias de idade, sendo 32 da linhagem 129P3/J e 32 da linhagem A/J, obtidos junto o biotério central da FOB-USP. Todos os camundongos permaneceram em gaiolas metabólicas (n=3 por gaiola), em salas com temperatura, umidade e os ciclos de claro/escuro controlados ($\approx 23 \pm 1^\circ\text{C}$, 60-80% e 12/12 h respectivamente). O período experimental foi de 42 dias, e durante todo este período os animais tiveram livre acesso a uma dieta semi-purificada de baixa concentração de F⁻ (cerca de 1 ppm) (AIN 76, PMI Nutrition, Richmond, IN, EUA) e água deionizada.

Ao fim do período experimental, 2 animais de cada linhagem foram anestesiados com uma mistura de Ketamina (Dopalen- Vetbrands) e Xilazina (Anasedan - Vetbrands) conforme o peso, de acordo com a indicação do fabricante. A cavidade torácica foi exposta e o coração puncionado para que se pudesse realizar perfusão cardíaca com PBS 0,01 M tamponado seguido de formaldeído 4% tamponado. As mandíbulas foram então coletadas e deixadas em formaldeído 4% tamponado por mais 16 h a 4°C. Posteriormente, as mesmas foram descalcificadas na solução de Morse (citrato de sódio 10% e ácido fórmico 22,5%) durante 24 h. Após este procedimento, as peças foram desidratadas em soluções com concentrações crescentes de etanol e diafanizadas em xilol para inclusão em Histosec® (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) fundida na estufa a 60 °C. Após inclusão das peças, foram obtidos cortes semi-seriados de 10 µm de espessura em micrótomo (Microm HM 340, Alemanha). Os cortes foram então corados com hematoxilina-eosina (HE).

Os outros 60 animais foram sacrificados por dosagem excessiva de anestésico e tiveram as mandíbulas coletadas, lavadas com tampão gelado (Tris

100 mM, EDTA 1 mM, PMSF 1 mM, pH 7,4) e congeladas imediatamente a -80°C. Posteriormente, os incisivos foram extraídos do osso alveolar, dissecados cuidadosamente, lavados em tampão fisiológico gelado e deixados secar por aproximadamente 2 min em temperatura ambiente, até o aparecimento de uma região branca e opaca. A partir dessa região, o incisivo foi dividido em zona 1, que compreende o estágio de secreção, e zona 2 que compreende o estágio de maturação (figura 9) (DEN BESTEN, 1986; PORTO; LINE; LAURE et al., 2006), e com auxílio de um bisturi a matriz foi raspada em tubos de 1,5 mL previamente pesados e identificados. Após a raspagem, os tubos foram novamente pesados para checar a quantidade de material conseguido (≈ 7 mg da zona 1 e ≈ 10 mg da zona 2 para o *pool* de 30 animais de cada linhagem).

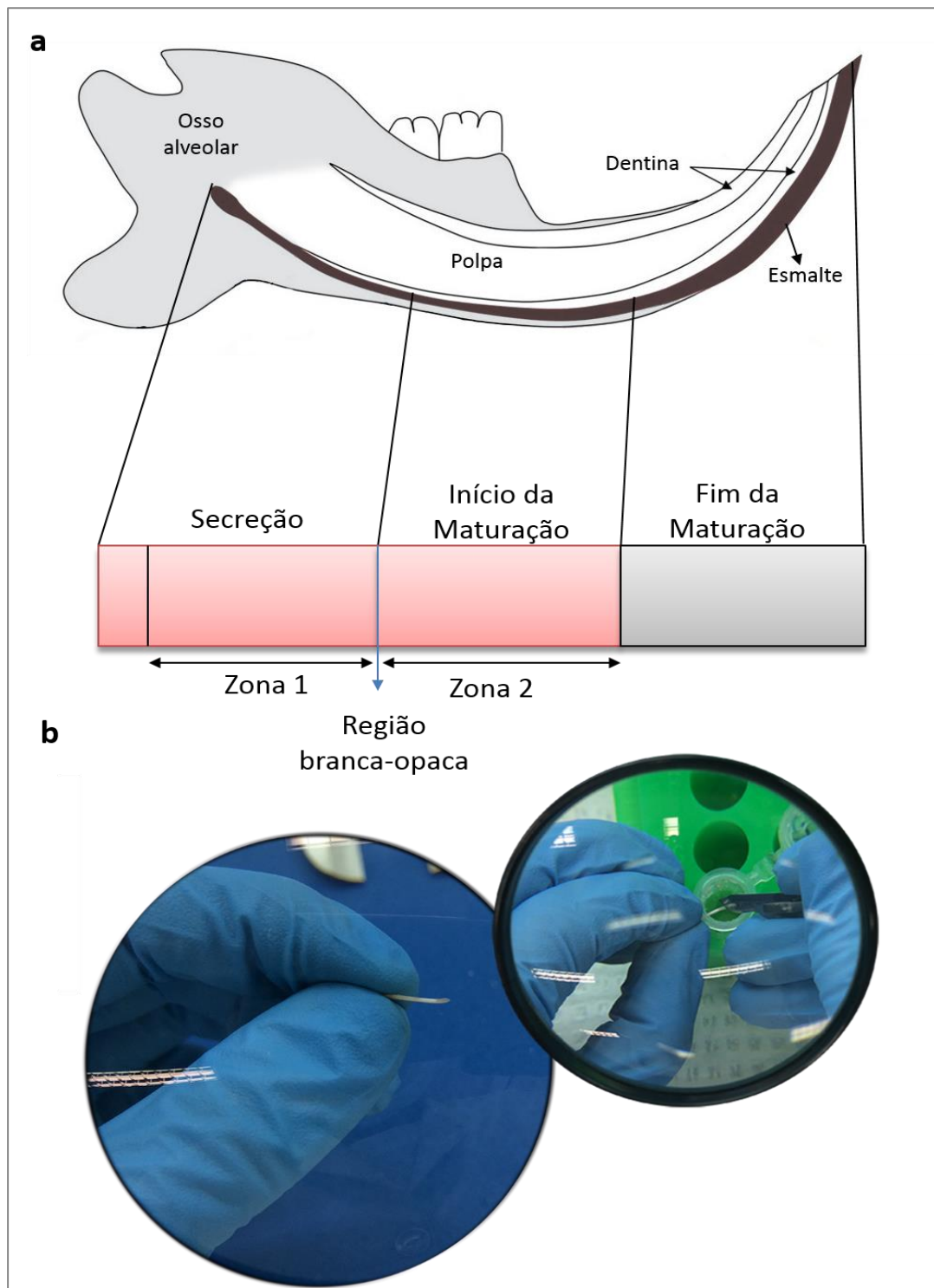


Figura 9. Representação do procedimento de coleta da matriz do esmalte. Em **a**, diagrama de um incisivo de camundongo ilustrando a localização aproximada das zonas 1 e 2 correspondentes à matriz de secreção e maturação respectivamente. Em **b**, uma foto reprodutiva do procedimento experimental.

3.2 OBTENÇÃO DO PROTEOMA DE ESMALTE

3.2.1 Extração das proteínas

Para extração das proteínas 500 µL de tampão de lise contendo uréia 7 M, tiouréia 2 M, CHAPS 4 %, DTT 1 % e um coquetel de inibidores de proteases foram adicionados às amostras, que foram em seguida submetidas a agitação em vórtex por 12 h a 4°C. Após homogeneização, as amostras foram centrifugadas a 8000 g por 10 min a 4°C (Eppendorf, R5409) e o sobrenadante coletado.

3.2.2 Eletroforese bidimensional associada a MS (2D-PAGE-MS)

Para a 2D-PAGE, 300 µL das amostras foram precipitadas com auxílio do kit *Clean-up* (GE, Healthcare) e ressuspensas em tampão de reidratação contendo uréia 7 M, tiouréia 2 M, DTT 18 mM, tampão IPG pH 3-10 e azul de bromofenol. Em seguida, foi realizada a quantificação proteica através do kit *Quick Start Bradford* (Bio-Rad) seguindo as recomendações do fabricante.

As proteínas foram primeiramente separadas de acordo com seu ponto isoelétrico (pI), através de focalização isoelétrica (IEF), utilizando o sistema *Ettan IPGphor 3* (GE Healthcare, Uppsala, Suécia) em tiras de gel de acrilamida de 13 cm com gradiente de pH 3-10 imobilizado (*Immobiline™ DryStrip*, GE Healthcare, Uppsala, Suécia). As tiras foram reidratadas durante 15 h a 20°C em 250 µL de solução de reidratação contendo aproximadamente 500 µg de proteínas. A separação por focalização isoelétrica foi realizada nas seguintes condições: 500 V por 1 h, 1.000 V por 1 h e, por fim, 10.000 V até atingir 40.000 V.

Após a focalização, as tiras foram equilibradas inicialmente em uma solução tampão (6 M uréia, 0,75 M de tris pH 8,8, 0,07 M SDS, 29,3% de glicerol e traços de azul de bromofenol) acrescida de 1% de DTT por 15 min para

redução das proteínas. Em seguida a solução foi descartada e substituída pelo mesmo tampão de equilíbrio acrescido de 2,5% de IAA, por mais 15 min, para alquilação das proteínas.

As tiras foram então transferidas para um gel de acrilamida vertical com gradiente de 5-20% de acrilamida (200 mm x 250 mm x 1 mm) e fixadas com uma solução pré-aquecida de 0,5% (p/v) de agarose solubilizada em tampão de corrida *Laemmli* (LAEMMLI, 1970). A separação eletroforética das proteínas foi conduzida no sistema no sistema SE 600 Ruby (Ge Healthcare) com uma pré-corrída com corrente fixa de 80 V, 15 mA/gel e 100 W por 20 min, para migração das proteínas da tira para o gel, e em sequência, a corrida foi conduzida com corrente constante de 120 V, 40 mA/gel e 100 W a 20°C, até que o azul de bromofenol atingisse o fundo do gel (aproximadamente 4 h).

Ao fim da corrida, o gel foi colocado em solução fixadora contendo ácido fosfórico 1,3% e metanol 20% durante 1 h, para prevenir a mobilidade das proteínas no gel. Ao fim da fixação, os mesmos foram lavados com água deionizada e deixados por 24 h em solução corante contendo 10% de ácido fosfórico, 10% de sulfato de amônio, 0,12% de *Coomassie Brilliant Blue G-250* e 20% de metanol. Por fim, os géis foram lavados com água deionizada e armazenados em solução de ácido acético 7% (CANDIANO; BRUSCHI; MUSANTE et al., 2004). Os géis corados foram digitalizados com resolução de 300 dpi com auxílio do programa *LabScan6.0* (GE Healthcare, Uppsala, Suécia) no *ImageScanner™ III* (GE Healthcare, Uppsala, Suécia) e os *spots* detectados através do programa *ImageMaster 2D Platinum 7.0* (GE Healthcare, Uppsala, Suécia).

Após serem detectados pelo *software*, os *spots* foram excisados dos géis e foram cortados em segmentos de aproximadamente 1 mm³, transferidas para tubos de 2,0 mL contendo 200 µL de ácido acético 5% e armazenados a 4°C até o passo seguinte. Posteriormente, os segmentos de gel foram lavados no mínimo por três vezes, em uma solução contendo acetonitrila (ACN) 50% (v/v) e bicarbonato de amônio (AmBic) 25 mM por 30 min, pois os géis deveriam estar totalmente descorados para passar ao próximo passo. Posteriormente, os mesmos foram desidratados duas vezes em ACN 100% por 10 min. Ao final da

segunda desidratação, a ACN foi removida e o resíduo remanescente deixado evaporar em temperatura ambiente.

Depois de desidratados, os *spots* foram submetidos à redução com DTT 20 mM em AmBic 50 mM incubados por 40 min a 56°C. O excesso de líquido foi removido e substituído por IAA 55 mM em AmBic 50 mM. Após 30 min no escuro, em temperatura ambiente, o líquido foi removido, os fragmentos foram lavados em AMBIC 25 mM e em seguida desidratados em ACN 100%. A ACN foi descartada e o resíduo remanescente no gel foi deixado evaporar em temperatura ambiente.

Para a digestão das proteínas, os fragmentos de gel foram reidratados em 15 µL de solução contendo 150 ng de tripsina (*Trypsin Gold Mass Spectrometry*, Promega, Madison, WI, EUA) em AmBic 25 mM por 15 min para que a tripsina pudesse penetrar no gel. Em seguida, adicionaram-se 50 µL de AmBic 25 mM para total cobertura dos *spots* e incubou-se a 37°C por 14 h. Ao fim de 14 h, a ação da tripsina foi interrompida pela adição de 15 µL de solução bloqueadora (ACN 50% v/v e ácido fórmico 5% v/v). Os peptídeos foram eluídos da acrilamida com duas lavagens de 15 min com solução de eluição A (ACN 50% v/v e ácido fórmico 1% v/v), uma lavagem de 15 min com solução de eluição B (metanol 60 % v/v e ácido fórmico 1 % v/v) e mais duas lavagens com ACN 100%, a 45°C sob sonicação em banho (Ultracleaner 1600A, Unique, Brasil) com 40 KHz de frequência fixa e potência de 30 W. A solução contendo os peptídeos extraídos foi submetida a secagem em concentrador a vácuo (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) em temperatura ambiente, por 2-3 h e armazenada a -20°C até a realização do sequenciamento (SHEVCHENKO; TOMAS; HAVLIS et al., 2006).

O sequenciamento das proteínas foi realizado na plataforma LC-MS/MS NanoAcquity Ultra Performance LC (Waters, Milford, MA, EUA), acoplada a uma fonte *nanoelectrospray* no espectrômetro de massas Q-TOF Ultima (Waters, Milford, MA, EUA), disponível no Laboratório Nacional de Biociências (LNBio), em Campinas, SP. Para tanto, os peptídeos foram solubilizados em 4,5 µL de ácido fórmico a 0,1%, transferidos para os tubos específicos e levados ao equipamento. Uma alíquota de 2,0 µL da mistura de peptídeos resultante foi separada por uma coluna C18 (100 µm x 100 mm) no nanoAcquity a um fluxo de

0,6 mL/min. O gradiente foi 2-90% de acetonitrila em ácido fórmico 0,1% por 10 min. Os espectros foram adquiridos usando o *software* MassLynx v.4.1 e os arquivos brutos foram convertidos para o formato mgf através do *software* Mascot Distiller v.2.3.2.0, 2009 (Matrix Science Ltd.), e submetidos à base de dados *Mouse International Protein Database* v. 3.73 (release 2010, June; 39711 sequences; 21109946 residues) usando a ferramenta de busca MASCOT v.2.3.01 (Matrix Science Ltd.), tendo como modificação fixa a carbamidometilação e modificação variável a oxidação da metionina, tolerância de 0,1 KDa, tanto para os resíduos precursores quanto para os resíduos já fragmentados. De uma maneira geral, os *softwares* de busca correlacionam os espectros de massa de fragmentação de peptídeos obtidos com espectros teóricos registrados em bancos de dados.

Foram consideradas positivas as identificações onde pelo menos três peptídeos eram encontrados, além de se considerar os valores *ion score* (mínimo de 34), e a acurácia entre os valores de massa molecular e pI experimental e teórico de cada *spot* também eram levados em consideração.

3.2.3 Cromatografia líquida de *ultraperformance* acoplada a espectrometria de massas (UPLC-MS/MS)

Para esta etapa, 50 µg de proteína foram transferidas para um microtubo e a estas adicionados 10 µL de bicarbonato de amônio 50 mM e 25 µL de surfactante RapiGest® 0,2% (Waters, Milliford, USA). Em seguida, as amostras foram reduzidas através da incubação a 40°C com DTT 100 mM por 40 min e posteriormente alquiladas pela adição de 300 mM de IAA por 30 min em temperatura ambiente. Em sequência, foi realizada a digestão proteolítica com a adição de 150 ng de tripsina grade MS (Promega) e incubação a 37°C por 14 h. Ao fim das 14 h, adicionou-se 10 µL de TFA 5% e incubou-se por mais 90 min a 37°C. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 14000 g durante 30 min. O sobrenadante contendo os peptídeos foi coletado e submetido à análise por UPLC-MS/MS (KRAMER-ALBERS; BRETZ; TENZER et al., 2007).

A análise dos peptídeos tripticos foi realizada no sistema nanoACQUITY UPLC (Waters, Milliford, USA) acoplado ao espectrômetro de massas Xevo Q-TOF G2 (Waters, Milliford, USA). Para tanto, o sistema UPLC nanoACQUITY foi equipado com uma coluna do tipo HSS T3 (Acquity UPLC HSS T3 column 75 mm x 150 mm; 1,8 μ m, Waters), previamente equilibrada com 7% da fase móvel B (100% ACN + 0,1 % ácido fórmico). Os peptídeos foram separados através de um gradiente linear de 7-85 % de fase móvel B durante 70 min com fluxo de 0,35 μ L/min e a temperatura da coluna mantida a 55°C. O MS foi operado em modo íon positivo, com o tempo de aquisição de dados de 70 min. Os dados obtidos foram processados através do software ProteinLynx GlobalServer (PLGS) versão 3.0 (Waters, Milliford, USA). A identificação das proteínas foi obtida através do algoritmo de contagem de íons incorporado ao *software*. Os dados obtidos foram buscados no banco de dados da espécie *Mus musculus* baixado do catálogo do UniProt (Universal Protein Resource).

3.3 ANÁLISE COMPUTACIONAL

As sequências das proteínas não caracterizadas foram buscadas na base de dados do UniProt (www.uniprot.org), obtidas no formato FASTA. Inicialmente as sequências foram analisadas pela ferramenta ProtParam (web.expasy.org/protparam/), a qual deduz as propriedades físico-químicas a partir da sequência de aminoácidos (aa) (GASTEIGER; HOOGLAND; GATTIKER et al., 2005). Posteriormente, as sequências foram submetidas ao servidor SABLE (<http://sable.cchmc.org/>) para predição da estrutura secundária (ADAMCZAK; POROLLO e MELLER, 2005).

O modelamento de estrutura tridimensional foi realizado através da modelagem comparativa por homologia. Duas proteínas são ditas homólogas quando compartilham uma similaridade maior que 25% (SANDER e SCHNEIDER, 1991). Assim, a sequência experimental é alinhada com uma ou mais sequências proteicas de estruturas conhecidas, que servirão de molde para predizer a estrutura da sequência alvo (ESWAR; WEBB; MARTI-RENOM et al., 2007; MARTI-

RENOM; STUART; FISER et al., 2000). Para obtenção das estruturas foi utilizado o servidor SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>) (ARNOLD; BORDOLI; KOPP et al., 2006; BORDOLI; KIEFER; ARNOLD et al., 2009). A sequências que não foram encontradas no SWISS-MODEL foram submetidas ao servidor I-TASSER, que utiliza restrições a partir de modelos identificados por vários programas de *threading* para construir um modelo através de simulações por de método de troca entre réplicas de Monte-Carlo (ZHANG, 2008; ZHANG, 2009; ZHANG; KIHARA e SKOLNICK, 2002). A qualidade dos modelos obtidos foi checada através das ferramentas PROCHECK, que verifica a qualidade estereoquímica da estrutura proteica analisando a geometria global da estrutura bem como a de cada resíduo da estrutura (LASKOWSKI; MACARTHUR; MOSS et al., 1993), e VERIFY3D, que determina a compatibilidade de um modelo atômico (3D) com a sua própria sequência de aminoácidos (1D), atribuindo uma classe estrutural com base em sua localização e ambiente (alfa, beta, loop, polar, não polar, etc) e compara os resultados com estruturas de boa qualidade (BOWIE; LUTHY e EISENBERG, 1991; EISENBERG; LUTHY e BOWIE, 1997; LUTHY; BOWIE e EISENBERG, 1992). Ambas ferramentas estão disponíveis no servidor SAVES (<http://services.mbi.ucla.edu/SAVES/>).

O servidor 3d2GO (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre/pfd/index.html>) foi utilizado para anotação funcional dos modelos obtidos para as sequências não caracterizadas. Para isso, o servidor analisa fontes de informação como homologia da sequência com sequências já funcionalmente anotadas e similaridade estrutural com sequências cuja geometria dos resíduos e função já são conhecidas (ALTSCHUL; MADDEN; SCHAFFER et al., 1997; MOLL e KAVRAKI, 2008).

A fim de entender a relevância biológica das proteínas encontradas, foi realizada uma análise funcional através do *plugin* ClueGo v 2.17 (BINDEA; MLECNIK; HACKL et al., 2009) que permite a integração e visualização dos termos do *Gene Ontology* (GO). Para tanto, o ClueGO utiliza estatísticas *kappa* para conectar os termos em uma rede. Resumidamente, o método estatístico *kappa* refere-se à medida quantitativa do grau de concordância sobre como as proteínas compartilham uma anotação de termos do GO (HUANG; SHERMAN; TAN

et al., 2007). Uma rede de interação proteica foi construída *in silico*, utilizando serviço de integração de base de dados PSICQUIC (PSI Common QUery InterfaCe), capaz de acessar 27 bases de dados, a fim de extrair as informações mais precisas referentes à lista *query* (ORCHARD, 2012). Todas as redes foram visualizadas através do *software* Cytoscape v 3.0.1 (SHANNON; MARKIEL; OZIER et al., 2003)

Resultados & Discussão

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ANÁLISE MORFOLÓGICA

A análise histológica revelou que nenhuma das linhagens apresentaram alterações morfológicas óbvias (figura 10). É possível observar que a camada de ameloblastos está bem organizada tanto na fase de secreção, quanto na fase de maturação. Além disso, os ameloblastos secretores apresentam o núcleo corretamente polarizado e citoplasma bem desenvolvido, característica marcante dessas células uma vez que estão em plena atividade de secreção proteica.

Com relação à fase de maturação é possível observar que ambas as linhagens apresentaram ligeira quantidade de material proteico, porém, as porções mais tardias da FM dos animais A/J ainda apresentam pequena acumulação de material proteínáceo, levando à crença de que a linhagem A/J naturalmente retém maior quantidade de proteína que animais da linhagem 129P3/J. Tais achados confirmam os resultados obtidos por Everett e colaboradores (2009), que também observaram maior retenção proteica por parte dos animais A/J, mesmo na ausência de exposição ao F⁻.

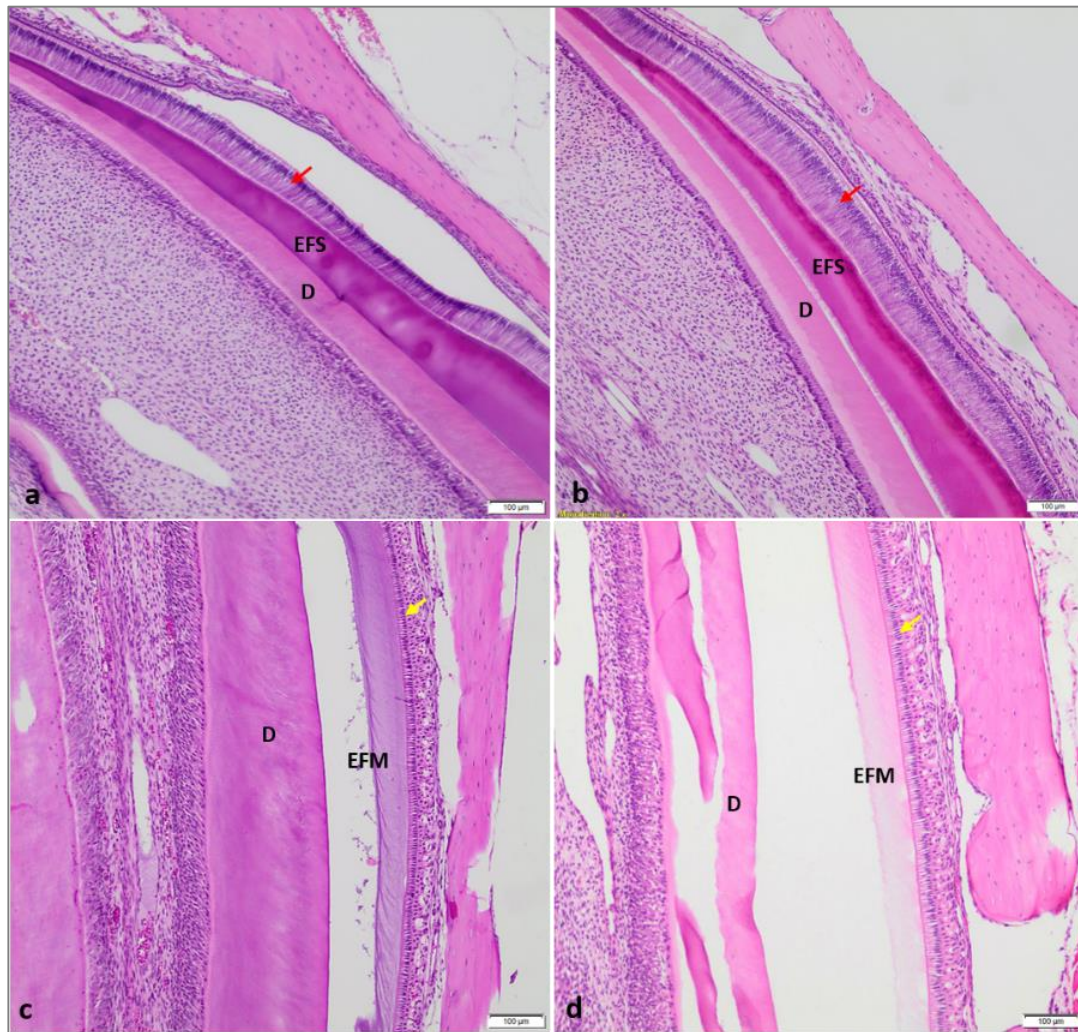


Figura 10. Fotomicrografia das regiões de secreção (a e b) e maturação (c e d) de camundongos A/J e 129P3/J, respectivamente. Ameloblasto secretor (→), ameloblasto maturador (→), esmalte em fase de secreção (EFS), esmalte em fase de maturação (EFM), dentina (D).

4.2 ANÁLISE PROTEÔMICA

De maneira geral, o protocolo de extração escolhido foi bastante satisfatório e apesar de o material ser escasso, possibilitou a remoção de uma grande quantidade de interferentes provenientes da matriz, garantindo amostras limpas e de boa qualidade, como podemos observar através dos géis bidimensionais (figuras 12 e 13), bem como pelos picos cromatográficos (figura 14).

Para o esmalte em fase de secreção (EFS), foram detectados 63 *spots* para os animais da linhagem A/J e 99 *spots* para os animais da linhagem 129P3/J. A análise do esmalte em fase de maturação (EFM) revelou a existência 16 *spots* para os animais da linhagem A/J e 8 *spots* para os animais da linhagem 129P3/J, respectivamente. Após análise por MS, um total de 72 proteínas (tabela 1) foram identificadas com sucesso, sendo 45 proteínas pertencente ao EFS dos A/J, 67 proteínas para a FS do 129P3/J, 12 proteínas para EFM dos A/J e 7 para FM dos 129P3/J. A análise por LC-MS/MS identificou um total de 64 proteínas (tabela 2), sendo que 45 estavam presentes no EFS e 34 no EFM dos A/J e 47 no EFS e 39 no EFM dos animais da linhagem 129P3/J.

A comparação das duas abordagens mostrou que 16 proteínas foram identificadas através das duas abordagens, 56 identificadas pela abordagem 2D-PAGE-MS e 48 através da UPLC-MS/MS. Assim, a identificação de proteínas através da 2D-PAGE-MS pareceu ser um pouco mais bem sucedida do que a UPLC-MS/MS. Esse fato pode ter ocorrido por dois motivos: o primeiro é que a quantidade de amostra obtida foi relativamente pequena, e a maior parte foi destinada à 2D-PAGE-MS, uma vez que devido ao método de coloração há a necessidade de uma maior quantidade de proteínas. Outro motivo pelo qual pode ter acontecido essa diferença é que muitas vezes proteínas de pouca abundância são mais facilmente detectadas quando presentes em misturas de poucas proteínas, assim como ocorre por exemplo nos *spots*, que pode apresentar uma ou algumas poucas proteínas que eventualmente apresentam MM e pI semelhantes. Isto ilustra como a separação em gel pode ser tão vantajosa para detectar proteínas de baixa abundância quanto o método de UPLC-MS/MS.

A combinação das duas abordagens, entretanto foi bastante satisfatória, resultando em um total de 120 proteínas identificadas, sendo 31 exclusivas ao EFS do 129P3/J, 10 exclusivas do EFS do A/J, 1 exclusiva ao EFM do A/J e 7 exclusivas ao EFM do 129P3/J (figura 11). Dessas, 113 proteínas são conhecidas e bem caracterizadas, tanto experimentalmente quanto funcionalmente, e apenas 7 proteínas foram classificadas como proteínas não caracterizadas (*putative uncharacterized protein*), a serem discutidas abaixo.

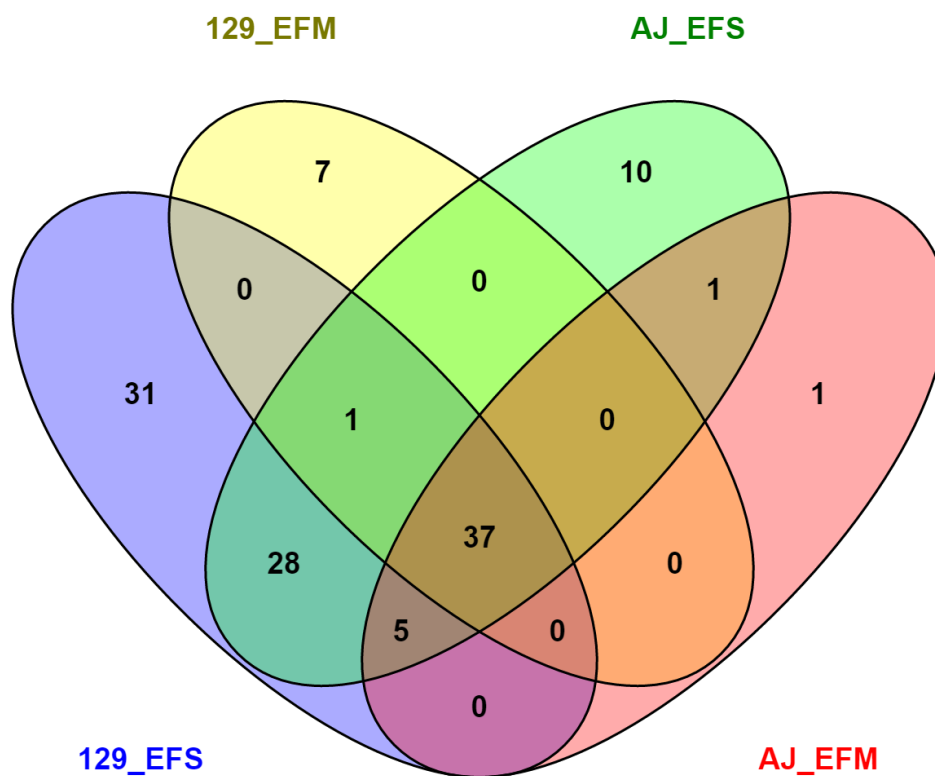


Figura 11. Diagrama de Venn comparando as proteínas encontradas para o esmalte em fase de secreção (EFS) das linhagens AJ e 129P3/J, e para o esmalte em fase de maturação (EFM) de ambas linhagens. O número em cada área do diagrama indica o número de proteínas associada entre os diferentes grupos.

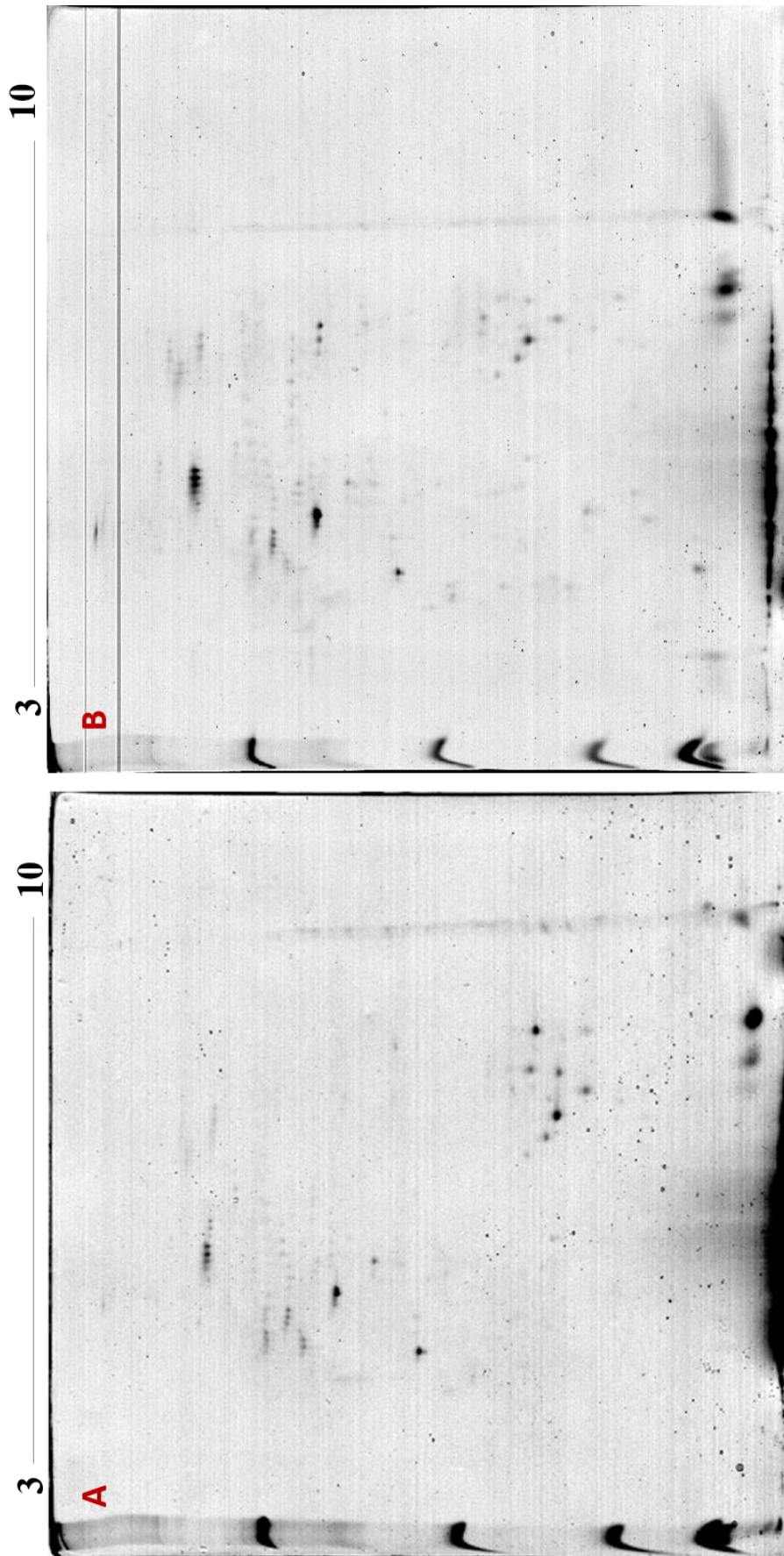


Figura 12. Gel bidimensional representativo para amostras provenientes do esmalte de secreção de animais da linhagem A/J (A) e 129P3/J (B). As proteínas foram focalizadas em strips de 13 cm e faixa de pH 3-10 linear, e em seguida separadas pela massa molecular em gel de poliacrilamida 5-20% e coradas com azul de Coomassie coloidal G250.

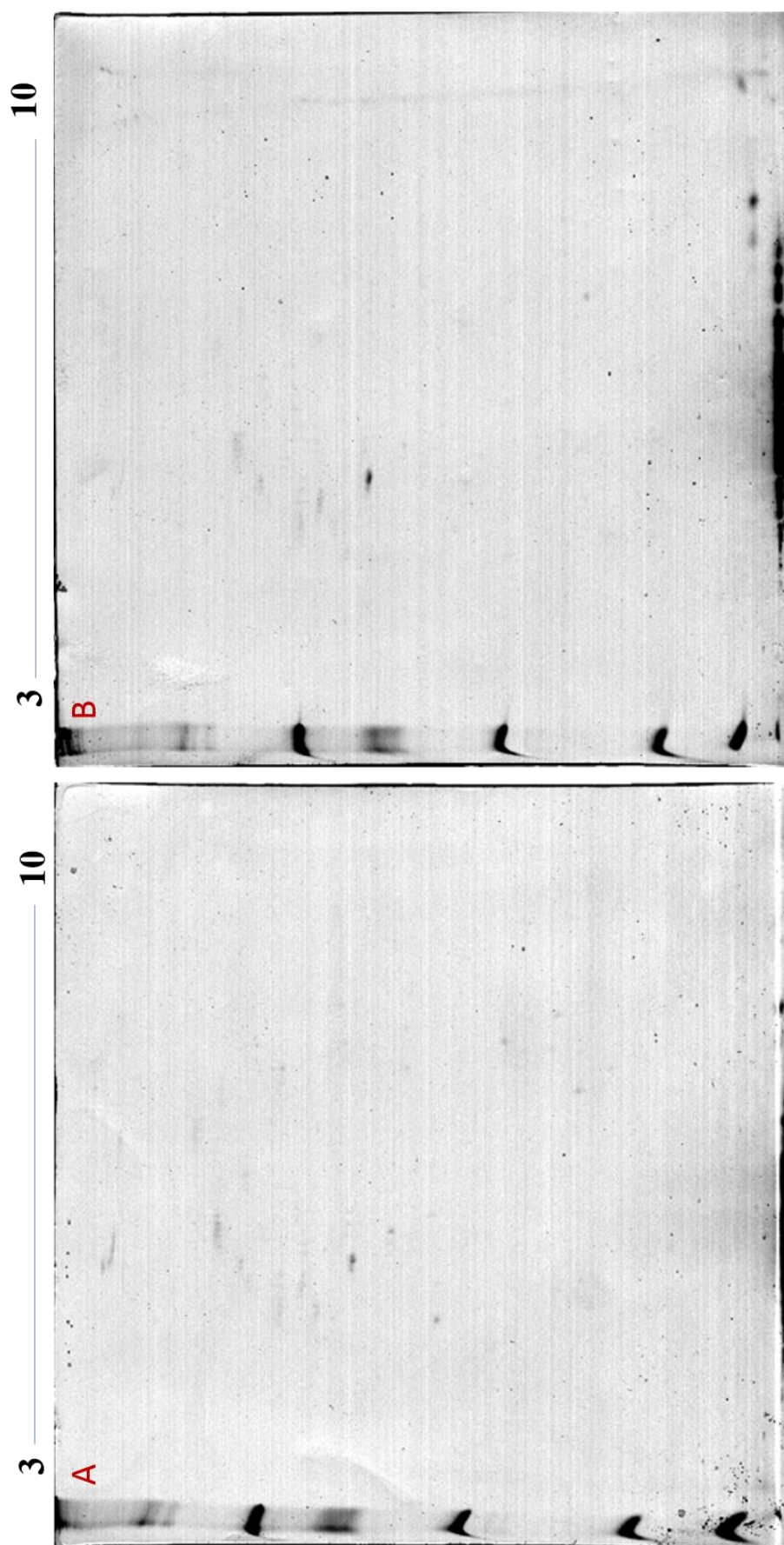


Figura 13. Gel bidimensional representativo para amostras provenientes do esmalte de maturação de animais da linhagem A/J (A) e 129P3/J (B). As proteínas foram focalizadas em *strips* de 13 cm e faixa de pH 3-10 linear, e em seguida separadas pela massa molecular em gel de poliacrilamida em gradiente 5-20% e coradas com azul de Coomassie coloidal G250.

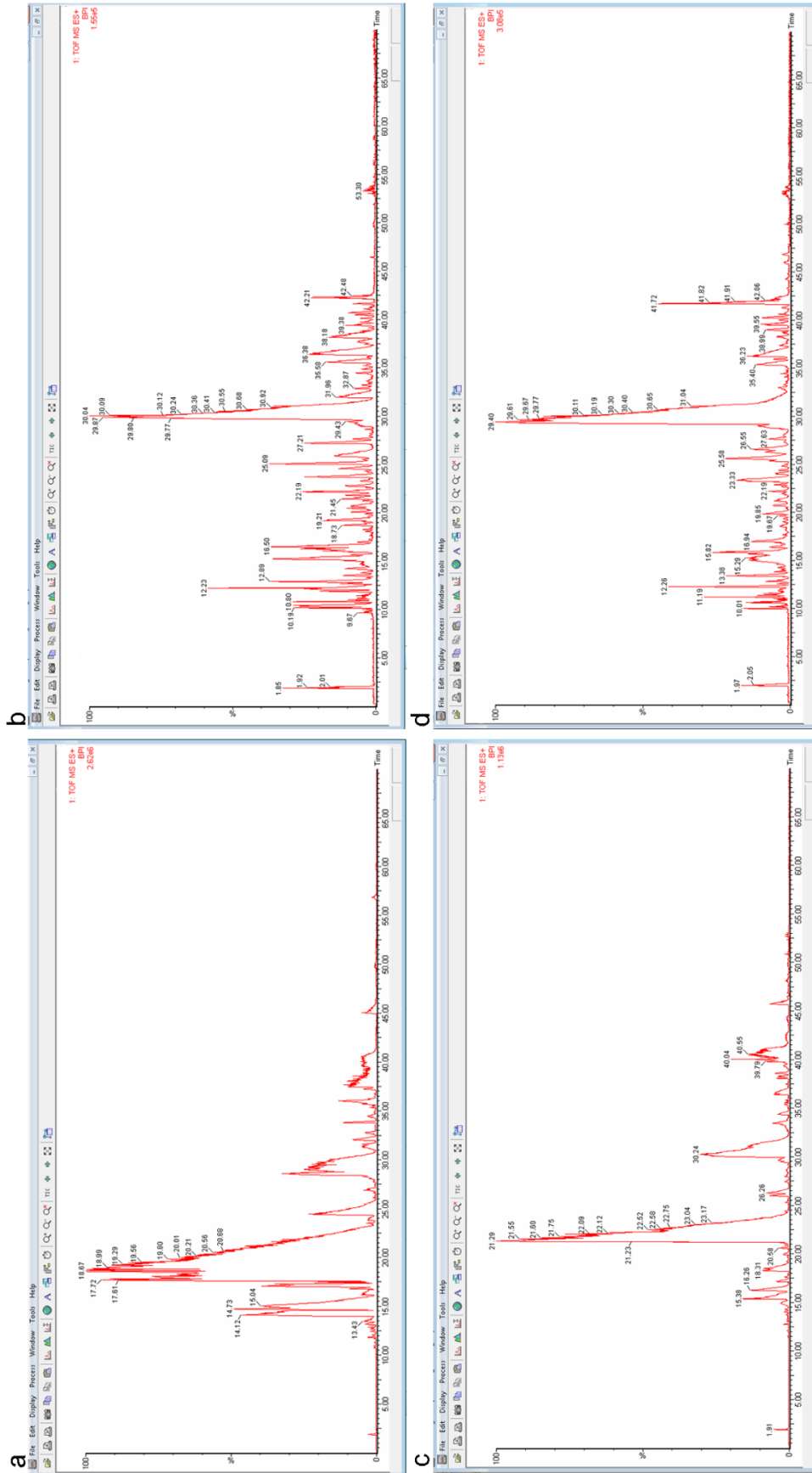


Figura 14. Cromatogramas obtidos para amostras de esmalte de fase de secreção e fase de maturação provenientes de incisivos de animais da linhagem 129P3/J (a e b) e A/J (c e d).

Tabela 1. Proteínas encontradas em esmalte de camundongos através da abordagem 2D-PAGE-MS.

UniProt ID	Identidade da Proteína	129_EFS	129_EFM	AJ_EFS	AJ_EFM
Q922U2	Keratin, type II cytoskeletal 5	+	+	+	+
P60710	Actin, cytoplasmic 1	+	-	+	-
P35700	Peroxiredoxin-1	+	-	+	-
O08807	Peroxiredoxin-4	+	-	+	-
P48036	Annexin A5	+	-	+	+
P07310	Creatine kinase M-type	+	-	-	-
P97298	Pigment epithelium-derived factor	+	-	-	-
P26231	Catenin alpha-1	+	+	+	+
Q80VJ8	Protein KASH5	+	+	+	+
P363101	14-3-3 protein zeta/delta	+	-	-	-
P62258	14-3-3 protein epsilon	+	-	-	-
P61982	14-3-3 protein gamma	+	-	-	-
Q99LL6	Col1a1 protein	+	-	+	-
P13020	Gelsolin	+	-	+	-
Q8BRH3	Rho GTPase-activating protein 19	+	-	+	-
P63260	Actin, cytoplasmic 2	+	-	+	-
Q70HX0	Tenascin-W	+	-	+	+
Q92111	Serotransferrin	+	-	-	-
Q9CQN1	Heat shock protein 75 kDa, mitochondrial	+	-	+	-
Q61576	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP10	+	-	+	-
P20029	78 kDa glucose-regulated protein	+	-	+	-
P29391	Ferritin light chain 1	+	-	+	-
P14152	Malate dehydrogenase, cytoplasmic	+	-	-	-
P21550	Beta-enolase	+	-	-	-
P56480	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	+	-	+	-
Q61171	Peroxiredoxin-2	+	-	-	-
PO5977	Myosin light chain 1/3, skeletal muscle isoform	+	-	-	-
P63028	Translationally-controlled tumor protein	+	-	-	-
Q61781	Keratin, type I cytoskeletal 14	+	-	+	-
P20152	Vimentin	-	-	+	+
P05213	Tubulin alpha-1B chain	-	-	+	+
Q9QZ83	Gamma actin-like protein	+	-	+	-
P63017	Heat shock cognate 71 kDa protein	+	-	+	+
Q6WVG3	BTB/POZ domain-containing protein KCTD12	+	-	+	+
Q9D051	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta, mitochondrial	+	-	+	-

Proteínas sombreadas em azul foram encontradas pelas duas abordagens; + encontrada; - não encontrada

Cont. Tabela 1

UinProt ID	Identidade da Proteína	129_EFS	129_EFM	AJ_EFS	AJ_EFM
P97429	Annexin A4	+	-	+	-
P67778	Prohibitin	+	-	-	-
Q9R0Y5	Adenylate kinase isoenzyme 1	+	-	+	-
Q00623	Apolipoprotein A-I	+	-	+	-
P97337	Odorant binding protein Ib	+	-	-	-
P97336	Odorant binding protein Ia	+	-	-	-
Q01768	Nucleoside diphosphate kinase B	+	-	-	-
P49722	Proteasome subunit alpha type-2	+	-	+	-
P30412	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase C	+	-	+	-
P63277	Amelogenin, X isoform	+	-	+	-
P13634	Carbonic anhydrase 1	+	-	-	-
P03995	Glial fibrillary acidic protein	-	-	+	-
P00920	Carbonic anhydrase 2	+	-	-	-
O54734	Dolichyl-diphosphooligosaccharide-- protein glycosyltransferase 48 kDa subunit	+	-	-	-
Q04447	Creatine kinase B-type	+	-	+	-
P0C871	Cytosolic phospholipase A2 beta	+	-	+	-
P02535	Keratin, type I cytoskeletal 109	+	-	+	-
P27773	Protein disulfide-isomerase A3	+	-	-	-
P19246	Neurofilament heavy polypeptide	-	-	+	-
P52480	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	+	-	-	-
Q62009	Periostin	+	-	-	-
P26443	Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial	+	-	-	-
P07356	Annexin A2	+	-	+	-
P16460	Argininosuccinate synthase	+	-	+	-
D2KHZ9	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	+	-	+	-
Q80Z71	Tenascin-N	+	-	+	+
Q62159	Rho-related GTP-binding protein RhoC	-	+	-	-
P17751	Triosephosphate isomerase	+	-	-	-
Q923D2	Flavin reductase (NADPH)	+	-	-	-
P63101	14-3-3 protein zeta/delta	+	-	-	-
Q9CY06	Putative uncharacterized protein	+	+	+	-
Q9CY10	Putative uncharacterized protein	+	+	+	+
Q9CV72	Putative uncharacterized protein	+	-	+	-
Q3UGS1	Putative uncharacterized protein	+	-	+	-
Q8BIS2	Putative uncharacterized protein	+	+	+	+
Q3TGC5	Putative uncharacterized protein	+	-	-	-
Q3UTK0	Putative uncharacterized protein	+	-	+	-

Proteínas sombreadas em azul foram encontradas pelas duas abordagens; + encontrada; - não encontrada

Tabela 2. Proteínas encontradas em esmalte de camundongos através da abordagem UPLC-MS/MS.

UinProt ID	Identidade da Proteína	129_EFS	129_EFM	AJ_EFS	AJ_EFM
P68033	Actin, alpha cardiac muscle 1	+	+	+	+
P68134	Actin, alpha skeletal muscle	+	+	+	+
P62737	Actin, aortic smooth muscle	+	+	+	+
P60710	Actin, cytoplasmic 1	+	+	+	+
P63260	Actin, cytoplasmic 2	+	+	+	+
P63268	Actin, gamma-enteric smooth muscle	+	+	+	+
P22599	Alpha-1-antitrypsin 1-2	+	-	+	-
P29699	Alpha-2-HS-glycoprotein	+	+	+	+
O55189	Ameloblastin	+	+	+	+
P63277	Amelogenin, X isoform	+	+	+	+
Q8BZW2	Ankyrin repeat domain-containing protein SOWAHB	+	-	-	-
Q00623	Apolipoprotein A-I	+	-	-	-
P56480	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	+	+	+	+
Q8BFZ3	Beta-actin-like protein 2	+	+	+	+
P12658	Calbindin	+	-	-	-
P11087	Collagen alpha-1(I) chain	+	-	+	-
Q01149	Collagen alpha-2(I) chain	+	-	+	-
Q04447	Creatine kinase B-type	+	-	+	-
P07310	Creatine kinase M-type	+	-	-	-
O55196	Enamelin	+	+	+	+
P29391	Ferritin light chain 1	+	+	+	+
P49945	Ferritin light chain 2	-	-	-	+
Q8R2T8	General transcription factor 3C polypeptide 5	-	-	+	-
P01942	Hemoglobin subunit alpha	+	+	+	+
P02088	Hemoglobin subunit beta-1	+	+	+	+
P02089	Hemoglobin subunit beta-2	+	+	+	+
P02104	Hemoglobin subunit epsilon-Y2	+	+	+	+
Q3TYV2	HERV-H LTR-associating protein 1 homolog	+	-	-	-
A8E0Y8	Immunoglobulin superfamily member 2	-	-	+	-
O89051	Integral membrane protein 2B	-	-	+	-
Q61765	Keratin, type I cuticular Ha1	-	+	-	-
Q61781	Keratin, type I cytoskeletal 14	+	+	+	+
Q61414	Keratin, type I cytoskeletal 15	+	+	+	+
Q9Z2K1	Keratin, type I cytoskeletal 16	-	+	-	-
Q9QWL7	Keratin, type I cytoskeletal 17	+	+	+	+
P05784	Keratin, type I cytoskeletal 18	-	+	-	-

Proteínas sombreadas em azul foram encontradas pelas duas abordagens; + encontrada; - não encontrada

Cont. Tabela 2

UinProt ID	Identidade da Proteína	129_EFS	129_EFM	AJ_EFS	AJ_EFM
P19001	Keratin, type I cytoskeletal 19	+	+	+	+
A1L317	Keratin, type I cytoskeletal 24	-	+	-	-
A6BLY7	Keratin, type I cytoskeletal 28	-	+	-	-
Q6IFX3	Keratin, type I cytoskeletal 40	-	+	-	-
Q6IFX2	Keratin, type I cytoskeletal 42	+	+	+	+
Q922U2	Keratin, type II cytoskeletal 5	+	+	+	+
P19788	Matrix Gla protein	-	-	+	-
P57748	Matrix metalloproteinase-20	+	+	+	+
Q9Z0J4	Nitric oxide synthase, brain	+	-	-	-
Q9EPX2	Papilin	+	+	+	+
Q99L02	PAXIP1-associated glutamate-rich protein 1	-	-	+	-
P17742	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	+	+	+	+
Q62009	Periostin	+	-	-	-
P35700	Peroxiredoxin-1	+	-	-	-
Q61171	Peroxiredoxin-2	+	-	+	-
P48678	Prelamin-A/C	+	-	+	-
Q6PKN7	Protein INCA1	-	-	+	-
P14069	Protein S100-A6	+	-	-	-
P19324	Serpin H1	+	-	-	-
P07724	Serum albumin	+	+	+	+
Q9DC26	Solute carrier family 46 member 3	-	-	+	-
Q80Z71	Tenascin-N	+	+	+	+
Q9R0Q3	Transmembrane emp24 domain-containing protein 2	-	-	+	-
Q7TMM9	Tubulin beta-2A chain	+	+	+	+
Q9CWF2	Tubulin beta-2B chain	+	+	+	+
Q9ERD7	Tubulin beta-3 chain	+	+	+	+
P99024	Tubulin beta-5 chain	+	+	+	+
P20152	Vimentin	+	+	+	+

Proteínas sombreadas em azul foram encontradas pelas duas abordagens; + encontrada; - não encontrada

4.2.1 Proteínas caracterizadas

Como mencionado anteriormente, os componentes da matriz desempenham importante papel na biomineralização do esmalte. Foi encontrado um total de 113 proteínas, porém é possível observar que muitas dessas são proteínas intracelulares, provenientes de eventual contaminação com os ameloblastos, uma vez que, por serem as células responsáveis pela secreção da matriz orgânica estão em íntimo contato com a matriz, como pode ser visualizado na figura 10. Deste modo, as proteínas foram submetidas à anotação funcional com relação às ontologias de “componente celular” e “função molecular”, para que se pudesse observar o potencial de cada uma a pertencer efetivamente à matriz orgânica.

A figura 15 e a tabela 3 demonstram os resultados de localização celular para as proteínas, onde é possível observar que aproximadamente 77% das proteínas foram associadas a “exossomos extracelulares”, seguido de “espaço extracelular” (38,37%), filamentos intermediários (20,93%) e “proteínáceos de matriz extracelular” (15,12%). Esta última chama a atenção por englobar as proteínas típicas do esmalte. Uma pequena porcentagem foi associada a categorias como “adesão focal”, “parte de fibras contráteis”, “borda de movimento celular” e “filamentos de queratina”, que por serem menos expressivas na amelogênese não foram analisadas para o “processo biológico”. Essas proteínas que, de maneira geral, foram relacionadas com localização extracelular foram submetidas à categorização por “processo biológico” do GO. Pode-se observar que os termos mais expressivos foram “biomineralização de tecidos” e “odontogênese” com 16,67% e 12,96% das sequências, respectivamente (figura 16 e tabela 4).

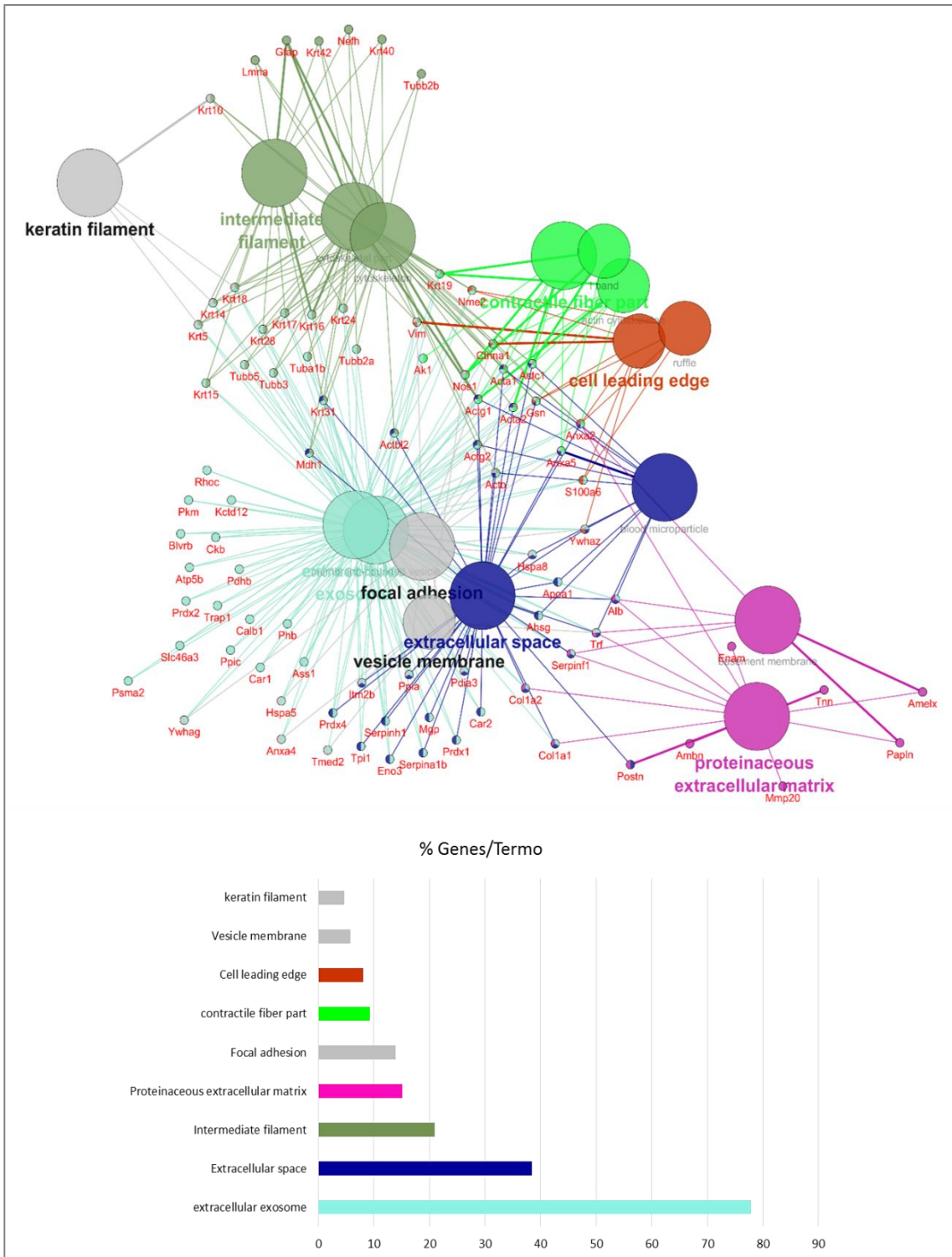


Figura 15. Mapa da localização celular anotada para as proteínas identificadas, obtido através do ClueGO (kappa score $\geq 0,4$).

Tabela 3. Proteínas associadas termos do GO após enriquecimento funcional para o “componente celular”.

GO ID	GO Term	GO Levels	n Genes	UniProtKB_AC
GO:0001726	Ruffle	3, 4	4	P07356; Q01768; P14069; P13020
GO:0005578	Proteinaceous extracellular matrix	2, 3	13	P07724; O55189; P63277; P11087; Q01149; O55196; Q9EPX2; P97298; Q92111; P57748; Q80Z71; Q62009; P07356
GO:0005615	Extracellular space	2, 3	33	P68134; P60710; P68033; P63260; P63268; P62737; P29699; P48036; Q00623; P00920; P19324; P21550; P27773; P63017; O89051; Q61765; P19788; P14152; P35700; P22599; P17751; P63101; Q8BFZ3; P17742; O08807; P07724; P07356; P11087; Q01149; P13020; Q62009; P97298; Q92111
GO:0005856	Cytoskeleton	4, 5, 6, 7	35	Q922U2; P26231; P03995; P02535; Q61781; Q61414; Q9Z2K1; Q01768; P05784; P19001; P48678; Q9Z0J4; P05213; Q9ERD7; P99024; P20152; P19246; Q6IFX3; Q6IFX2; A6BLY7; Q9CWF2; A1L317; P68134; P60710; P68033; P63260; P63268; P62737; Q8BFZ3; P07356; P13020; Q61765; P14152; Q7TMM9; Q9QWL7
GO:0005882	Intermediate filament	3, 4, 5, 6, 7, 8, 9	18	P03995; P02535; Q61781; Q61414; Q9Z2K1; Q9QWL7; P05784; P19001; Q61765; Q922U2; Q6IFX3; Q6IFX2; A6BLY7; A1L317; Q01768; P48678; P20152; P19246
GO:0005925	Focal adhesion	4, 5	12	P20029; P61982; P60710; P48036; P26231; P13020; P63017; P27773; P17742; P20152; P63101
GO:0031252	Cell leading edge	2, 3	7	P07356; Q01768; P14069; P63101; P26231; P20152; P13020
GO:0044449	Contractile fiber part	2, 3, 4, 5, 6, 7, 8	8	P68134; P68033; P63260; P62737; P48036; P19001; Q9Z0J4; Q9R0Y5
GO:0045095	Keratin filament	4, 5, 6, 7, 8, 9, 10	4	Q922U2; P02535; Q61781; P05784
GO:0070062	Extracellular exosome	3, 4, 5	67	P68134; P60710; P63260; P63268; P62737; Q8BFZ3; P29699; Q9R0Y5; P07356; P07724; P48036; P97429; Q00623; P16460; P56480; P12658; P13634; Q923D2; Q01149; P00920; Q04447; P13020; P21550; P20029; P63017; O89051; Q61781; Q61414; Q9Z2K1; P61982; Q9QWL7; P05784; P19001; A1L317; P20152; A6BLY7; Q6IFX3; Q6IFX2; Q922U2; P63101;; Q01768; P19788; P14152; P99024; P27773; P67778; Q9D051; P35700; P17742; O08807; P52480; P30412; Q61171; P14069; Q62159; P49722; P97298; P19324; P22599; P17751; Q9DC26; Q92111; Q9CQN; P05213; Q7TMM9; Q9ERD7; Q6WVG3

Tabela 4. Proteínas associadas termos do GO após enriquecimento funcional para “processos biológicos”.

GO ID	GO Term	GO Levels	n Genes	UniProtKB_AC
GO:0006953	Acute-phase response	6	3	P22599; P29699; O54734
GO:0015669	Gas transport	3, 4, 5	4	P00920; P02088; P02089; P01942
GO:0018208	Peptidyl-proline modification	7, 8	3	Q61576; P17742; P63017
GO:0031214	Biom mineral tissue development	4, 5, 6	7	O55189; P63277; P11087; O55196; P57748; P19788; P29699
GO:0042476	Odontogenesis	4, 5, 6, 7	9	O55189; P63277; P11087; Q01149; O55196; P57748; P19324; P19788; P29699
GO:0045780	Positive regulation of bone resorption	3, 4, 5, 6, 7, 8	3	Q92111; P00920; P29699
GO:0050710	Negative regulation of cytokine secretion	4, 5, 6, 7, 8, 9, 10	2	Q00623; P97429
GO:0072350	Tricarboxylic acid metabolic process	6, 7	2	P26443; P14152
GO:2000242	Negative regulation of reproductive process	2, 3, 4	2	P97298; O08807

Dentre as 113 proteínas caracterizadas, 9 delas foram relacionadas aos termos “odontogênese e biomineralização de tecidos”. Essas foram então analisadas *in silico* para verificação de possíveis interações com outras proteínas e o resultado obtido é mostrado na figura 17.

Neste ponto observou-se que das 9 proteínas, 4 são conhecidas como proteínas típicas do esmalte, a amelogenina (AMELX), ameloblastina (AMBN), enamelina (ENAM) e MMP-20. Um fato interessante é que dentre as proteínas típicas do esmalte, apenas a amelogenina foi identificada através da 2D-PAGE-MS (tabelas 1 e 2). Já a UPLC-MS/MS foi capaz de identificar, além da AMELX, as proteínas MMP-20, AMBN e ENAM (tabela 2). Isso pode ter ocorrido devido à pouca abundância dessas proteínas no esmalte, em conjunto com as propriedades físico-químicas dessas proteínas, como por exemplo baixa MM e pl exibido pela AMBN. Nenhuma das duas abordagens detectou a calicreína 4 e amelotina, e uma das razões pode ser o fato de serem produzidas apenas no estágio de secreção e em baixa quantidade, fato o que comprova a dificuldade relatada por outros pesquisadores em obter preparações a partir da matriz do esmalte (IWASAKI; BAJENOVA; SOMOGYI-GANSS et al., 2005; MORADIAN-OLDAK,

2012), sendo essa a razão primária pela qual a pesquisa envolvendo proteínas do esmalte é tão difícil. Essas 4 proteínas apresentaram perfil semelhante para as duas linhagens, estando todas presentes tanto no EFS quanto no EFM, o que de certa forma era esperado, justamente por já serem bem conhecidas. Entretanto, esses dados sugerem que nenhuma dessas proteínas possam vir a apresentar um papel substancial com relação às diferenças genéticas apresentada por estas linhagens perante ao F^- .

Essas proteínas do esmalte devem interagir com outras proteínas e/ou moléculas, a fim de tornar a matriz orgânica capaz de promover a nucleação dos cristais de hidroxiapatita, bem como guiar o crescimento desses cristais. Podemos observar na figura 16 que a ENAM, uma das proteínas estruturais do esmalte, interage com a anexina A2 (ANXA2), anidrase carbônica 3 e com colágeno tipo 5 e tipo 2. Esses dados advêm de um estudo que objetivou catalogar através de ensaios de duplo híbrido em levedura (YH2) proteínas capazes de interagir com AMELX, AMBN e ENAM. Os autores identificaram um pequeno número de proteínas de membrana, proteínas envolvidas no transporte de Ca^{++} e mineralização dos tecidos, e colágenos (WANG; TANNUKIT; ZHU et al., 2005).

No presente trabalho, a proteína ANXA2 foi encontrada em ambas as linhagens, mas apenas no EFS. Na rede de interação (Figura 16) a mesma não se encontra marcada em azul por não ser relacionada com os termos “odontogênese” ou biomineralização”. Trata-se de uma proteína composta de 339 aa ligante de Ca^{++} e fosfolipídeos. Os membros da família das anexinas atuam na regulação do crescimento celular e nas vias de transdução de sinal (GERKE e MOSS, 2002). O papel das anexinas no desenvolvimento dentário parece estar relacionado com a exocitose e endocitose, uma vez que anexinas I-V foram encontradas em ameloblastos secretores e a ANXA2 foi também encontrada em vesículas secretoras, podendo estar relacionadas com a regulação do Ca^{++} (GOLDBERG; FEINBERG; RAINTEAU et al., 1990). Além disso, a expressão de *Anxa2* foi mostrada como sendo estágio específico na amelogênese. Esse estudo encontrou uma forte expressão de *Anxa2* no estágio de pré-secreção, baixa expressão no estágio de secreção e uma forte expressão

no início e fim do estágio de maturação (FUKUMOTO; YUASA; YAMADA et al., 2005). Assim, apesar de ser classificada como uma proteína intracelular, o fato de ANXA2 interagir com a ENAM, indica a possibilidade dessa proteína ser secretada para o esmalte e, por ter um papel na regulação do Ca^{++} , atuar na nucleação dos cristais de hidroxiapatita. Entretanto estudos futuros devem ser conduzidos para a verificação desta hipótese.

Outra proteína identificada foi a alpha-2-HS-glycoprotein (AHSG), uma glicoproteína presente no soro, envolvida em diversos processos como endocitose, desenvolvimento cerebral e formação do tecido ósseo (DENECKE; GRABER; SCHAFER et al., 2003; JAHNEN-DECHENT; SCHINKE; TRINDL et al., 1997; KALABAY; CSEH; PAJOR et al., 2002). Foi primeiramente relacionada com amelogênese no trabalho de Wang e colaboradores (2005). Os autores levantaram a hipótese de que essa proteína poderia apresentar funções regulatórias no controle de proteínas envolvidas na iniciação e crescimento dos cristais de hidroxiapatita, já que a mesma interagiu diretamente com as proteínas AMELX e ENAM, típicas do esmalte (figura 16). No presente trabalho, a AHSG foi encontrada em ambas as linhagens, tanto no EFS quanto no EFM. Esse resultado sugere que essa proteína pode realmente desempenhar um importante papel na regulação de proteínas que atuam no controle da mineralização, já que a mesma está presente durante todo o processo de secreção das proteínas e mineralização, aumentando a probabilidade dos dados obtidos por Wang e colaboradores (2005) estarem corretos.

Um fato interessante é que no presente estudo foi encontrado o colágeno tipo I alfa 1 (COL1A1) e colágeno tipo I alfa 2 (COL1A2) (tabelas 1 e 2), que estava presente apenas no EFS, para ambas as linhagens. A presença do colágeno é somente relatada no enamelóide, uma espécie de esmalte encontrado predominantemente em peixes, mas vista como inexistente no esmalte dentário de mamíferos (GIBSON; YUAN; HALL et al., 2001; WAKITA, 1993). Entretanto, um estudo avaliou esmalte obtido de 120 dentes humanos através de HPLC e, embora em pouca quantidade, encontrou colágeno tipo I no esmalte maduro (ACIL; MOBASSERI; WARNKE et al., 2005). Estudos epidemiológicos encontraram uma associação entre polimorfismos no gene *COL1A2* e fluorose

dentária em populações expostas a altos níveis de F através da água (> 2 mg/L), relatando que indivíduos que carregavam o genótipo homozigoto PP *Pvull* apresentaram um risco 5 vezes maior de desenvolver fluorose quando comparados àqueles que carregavam o genótipo homozigoto pp, na área de fluorose endêmica. Entretanto, o risco não foi elevado quando a população controle foi recrutada de uma área não endêmica de fluorose (HUANG; BA; CUI et al., 2008). Mais recentemente, foi demonstrado que animais da linhagem A/J submetido a exposição ao F⁻, apresentaram no EFM a COL1A1 (CHARONE, 2013). Assim, os resultados do presente estudo trazem novas perspectivas sobre a presença de colágeno no esmalte. Sem dúvida é preciso realizar mais estudos, como por exemplo uma imunolocalização, para confirmar se de fato essa proteína está presente no esmalte e avaliar ainda outros roedores para confirmar os achados, ou ainda saber se é apenas mais uma característica intrínseca destas linhagens.

A serpina H1 (SERPH1), é uma chaperona envolvida na montagem da tripla hélice do colágeno e que, eventualmente, é transportada para o espaço extracelular. Ao contrário de outras chaperonas, a SERPH1 não participa do processamento de outras proteínas e, portanto, sua expressão é restrita a células que sintetizam colágeno (KURKINEN; TAYLOR; GARRELS et al., 1984; TAGUCHI e RAZZAQUE, 2007; WIDMER; GEBAUER; BRUNSTEIN et al., 2012). Mutações no gene dessa proteína estão associadas à osteogênese imperfeita, e indivíduos acometidos por essa doença também apresentam dentes frágeis (DROGEMULLER; BECKER; BRUNNER et al., 2009). No presente trabalho essa proteína foi encontrada no EFS dos animais da linhagem 129P3/J apenas (tabela 2). A presença dessa proteína é mais um indicativo de que a presença do colágeno durante a amelogênese talvez seja verídica. Entretanto, é necessário reafirmar a necessidade de se conduzir mais experimentos que comprovem essa hipótese.

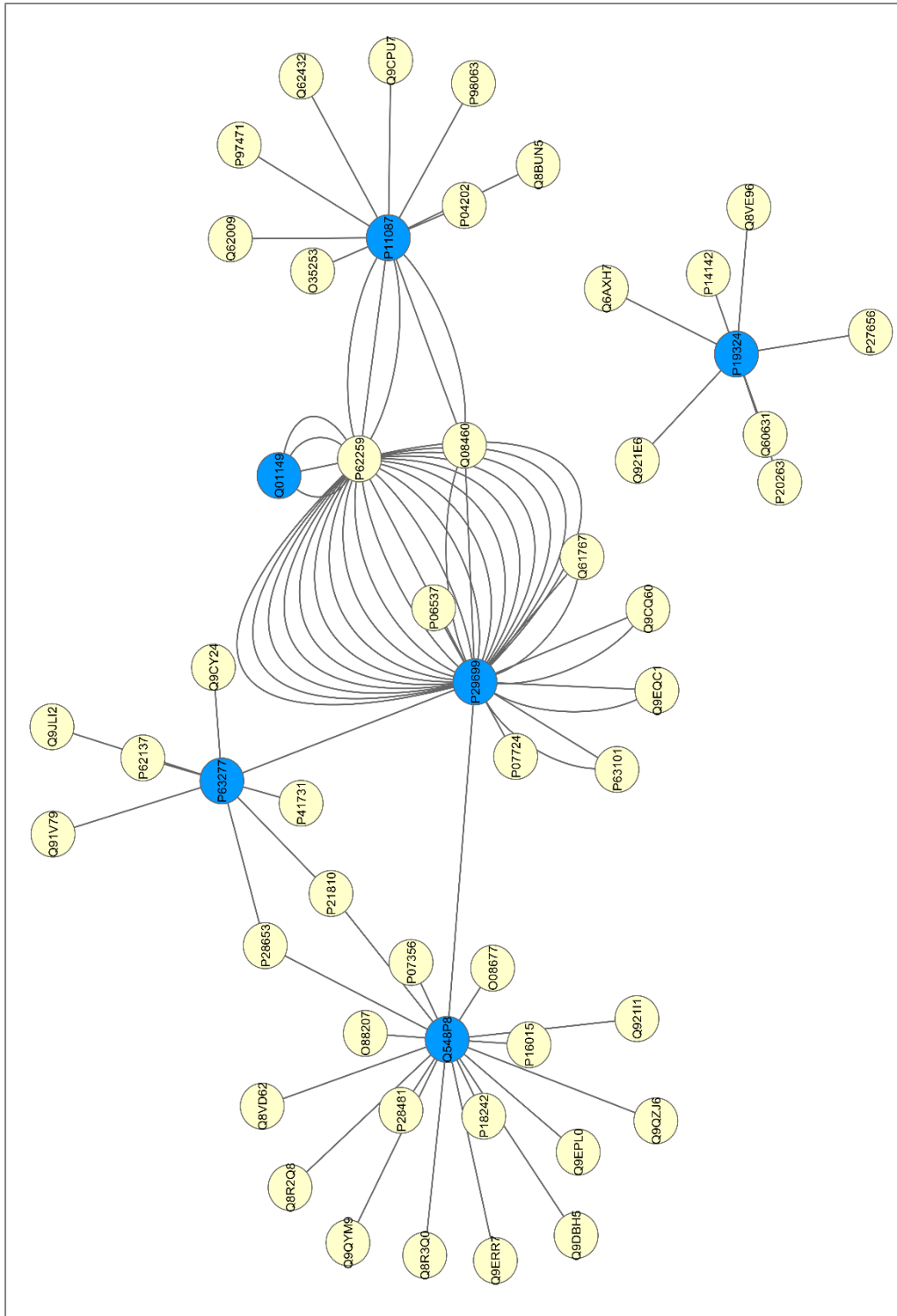


Figura 17. Rede de interação obtida *in silico*, mostrando as interações entre as proteínas encontradas (azul) com outras proteínas. Chama a atenção as interações da ENAM (O548P8) como colágeno tipo 5 (O88207), colágeno tipo 2 (P28481), ANXA2 (P07356) e AHSG (P29699). Esta última também interage diretamente com a AMELX (P63277)

Apesar de não terem sido categorizadas como proteínas do meio extracelular, algumas das proteínas encontradas no presente estudo poderiam ser associadas ao processo de biomineralização por atuarem como canais iônicos ou transportadoras e, por isso, merecem atenção. A calbindina (CALB1) é uma proteína de ligação ao Ca^{++} citoplasmático que está envolvida na difusão e tamponamento do Ca^{++} , a fim de manter a baixa concentração fisiológica deste elemento no meio intracelular, sendo considerada um componente essencial do transporte trans-epitelial do Ca^{++} (JEON, 2008). Estudos utilizando hibridização *in situ* (ISH) encontraram níveis elevados de mRNA em ameloblastos durante a fase pré-secretora, início da secreção e início da maturação, sugerindo que essa proteína atue na amelogênese (BERDAL; HOTTON; SAFFAR et al., 1996; HOTTON; DAVIDEAU; BERNAUDIN et al., 1995). No presente estudo, a CALB1 foi identificada no EFS da linhagem 129P3/J, e deste modo comprova os resultados prévios, indicando que essa proteína realmente está envolvida na biomineralização do esmalte, já que atua no transporte de Ca^{++} .

Outra proteína interessante encontrada no EFS da linhagem 129P3/J foi a proteína S100-A6 (S100A6). Membros desta família também estão associados à modulação do Ca^{++} . Dados transcriptômicos obtidos através de ISH, encontraram altos níveis de expressão do *S100a4* durante o estágio de maturação em relação a secreção (LACRUZ; SMITH; MOFFATT et al., 2012), e em conjunto com os dados do presente estudo sugere a existência de uma maquinaria especializada no transporte deste íon durante a mineralização do esmalte.

Por fim, a proteína *solute carrier Family 46 member 3* (SLC46A3), encontrada no EFS da linhagem A/J, aparentemente é uma proteína transmembranar e está envolvida no transporte de solutos cujo gene codificante está localizado no cromossomo 13. Entretanto, sua existência a nível de proteína ainda não foi comprovada, sendo descrita aqui pela primeira vez. Outros membros dessa família são associados ao transporte de fosfato, o que é de extrema importância para a mineralização do esmalte. A incorporação de íons fosfato nos cristais de esmalte tem sido observada através de estudos envolvendo fosfato radioativo (^{32}P e ^{33}P) em incisivo de roedores e os resultados

indicam que a incorporação de fosfato aumenta no estágio de maturação. Entretanto, os mecanismos para o transporte deste íon permanecem obscuros (MCKEE; ZEROUNIAN; MARTINEAU-DOIZE et al., 1987; REITH e BOYDE, 1981; ROBINSON; HILLER e WEATHERELL, 1974). Recentemente, o gene *Slc34a2* foi identificado como possível candidato para o transporte de fosfato no órgão do esmalte, uma vez que a expressão do mesmo encontrava-se 64 vezes aumentada no estágio de maturação, em relação ao estágio de secreção (LACRUZ; SMITH; MOFFATT et al., 2012). Deste modo, é possível que esta proteína traga novas perspectivas sobre o transporte de íons fosfato durante a amelogênese, e certamente novos estudos deverão ser conduzidos na tentativa de esclarecer os mecanismos envolvidos na incorporação de fosfato no processo de mineralização.

O fato das proteínas SERPH1, CALB1 e S100A6 terem sido encontradas apenas na linhagem 129P3/J não significa que as mesmas não existam na linhagem A/J, mas apenas que talvez o limite de detecção não tenha sido suficiente para identificá-las, e o mesmo raciocínio pode ser inferido para a SLC46A3, que estava presente apenas na linhagem A/J.

4.2.2 Proteínas não caracterizadas

Proteínas não caracterizadas (*putative uncharacterized protein*) são proteínas preditas a partir dos quadros abertos de leitura conhecidos como ORF (*open reading frame*), mas para as quais não há nenhuma evidência experimental de tradução. Elas constituem uma fração substancial do proteoma, tanto de procariontos como de eucariontos e por esta razão não podem ser ignoradas (DESLER; DURHUUS e RASMUSSEN, 2012). No presente estudo, sete sequências foram encontradas como possíveis proteínas não caracterizadas. Neste caso, foram utilizadas ferramentas de bioinformática a fim de estabelecer uma modelagem por homologia para deduzir a estrutura tridimensional da proteína não caracterizada e conseqüentemente tentar inferir sua função.

As propriedades físico-químicas foram obtidas através da análise das

sequências pelo ProtParam, e estão descritas na tabela 5. Todas as proteínas hipotéticas analisadas podem ser consideradas hidrofílicas, uma vez que os valores obtidos para o GRAVY foram todos negativos. Das 7 sequências analisadas, 4 apresentaram índice de instabilidade maior do que 40, sugerindo que estas proteínas tendem a ser mais instáveis e, portanto, ter uma vida mais curta (GURUPRASAD; REDDY e PANDIT, 1990) ou sofrer proteólise, gerando fragmentos menores, o que é bastante típico do esmalte (MORADIAN-OLDAK, 2012).

Tabela 5. Propriedades físico-químicas das proteínas hipotéticas.

Seq.	Nº aa.	MM (Da)	pl	Asp+Glu	Arg+Lys	CE	IA	II	GRAVY
Q9CY06	142	15112	7,97	13	14	9970	86,69	7,86	-0,049
Q9CY10	142	15202	8,95	11	14	10095	83,24	11,18	-0,129
Q9CV72	278	30011	5,40	38	31	22015	83,24	44,92	-0,463
Q3TGC5	187	20889	5,36	25	20	41035	75,51	28,53	-0,537
Q3UTK0	826	89057	4,87	115	82	40715	65,80	68,96	-0,676
Q3UGS1	319	37519	8,94	33	42	98945	71,54	46,89	-0,564
Q8BIS2	538	58266	8,47	65	69	38195	75,26	50,29	-0,471

aa, aminoácidos; MM, massa molecular, pl, ponto isoelétrico; CE, coeficiente de extinção molar; IA, índice alifático; II, índice de instabilidade; GRAVY, *Grand average of hydropathicity* (índice de hidropaticidade média)

Na tentativa de inferir alguma função das sequências hipotéticas, as mesmas foram analisadas por ferramentas computacionais, que permitem o modelamento por comparação e homologia. Essas ferramentas fornecem resultados razoáveis, uma vez que assumem que a estrutura terciária de duas proteínas seria similar desde de que suas sequências estejam relacionadas (BORDOLI; KIEFER; ARNOLD et al., 2009). De maneira geral os modelos obtidos foram satisfatórios. A qualidade e a acurácia dos modelos foram acessadas através do gráfico de Ramachandran (RAMACHANDRAN; RAMAKRISHNAN e SASISEKHARAN, 1963) obtidos pelo PROCHEK (figura 18). Os modelos obtidos para as sequências Q9CY06, Q9CY10 e Q3UTK0 mostraram uma boa

porcentagem dos resíduos de aa nas regiões permitidas (vermelho), e alguns nas regiões adicionalmente permitidas (amarelo escuro) e generosamente permitidas (amarelo claro). Por outro lado, as sequências Q9CV72, Q3TGC5, Q3UGS1 e Q8BIS2 apresentaram 2, 1, 11 e 3 resíduos, respectivamente, nas regiões não permitidas (branco).

A existência desses resíduos impactou na qualidade dos modelos gerados para as sequências Q9CV72 e Q8BIS2, pois estes não passaram no teste de qualidade do VERIFY_3D, que determina a compatibilidade de um modelo atômico (3D) com a sequência linear de aa (1D) e exige que pelo menos 65% dos aa tenham um score $\geq 0,2$ (tabela 6).

Tabela 6. Qualidades estéreo-químicas dos modelos obtidos.

Seq.	Gráfico de Ramachandran (%)				VERIFY_3D (%)
	Região permitida	Região adicionalmente permitida	Região generosamente permitida	Região não permitida	
Q9CY06	90,2	9,8	0,0	0,0	100,00
Q9CY10	90,0	10,0	0,0	0,0	98,43
Q9CV72	88,2	9,4	1,2	1,2	40,68
Q3TGC5	83,9	15,5	0,0	0,6	94,12
Q3UTK0	93,3	6,7	0,0	0,0	78,57
Q3UGS1	63,6	24,6	7,9	3,9	67,08
Q8BIS2	87,6	9,8	1,0	1,6	16,67

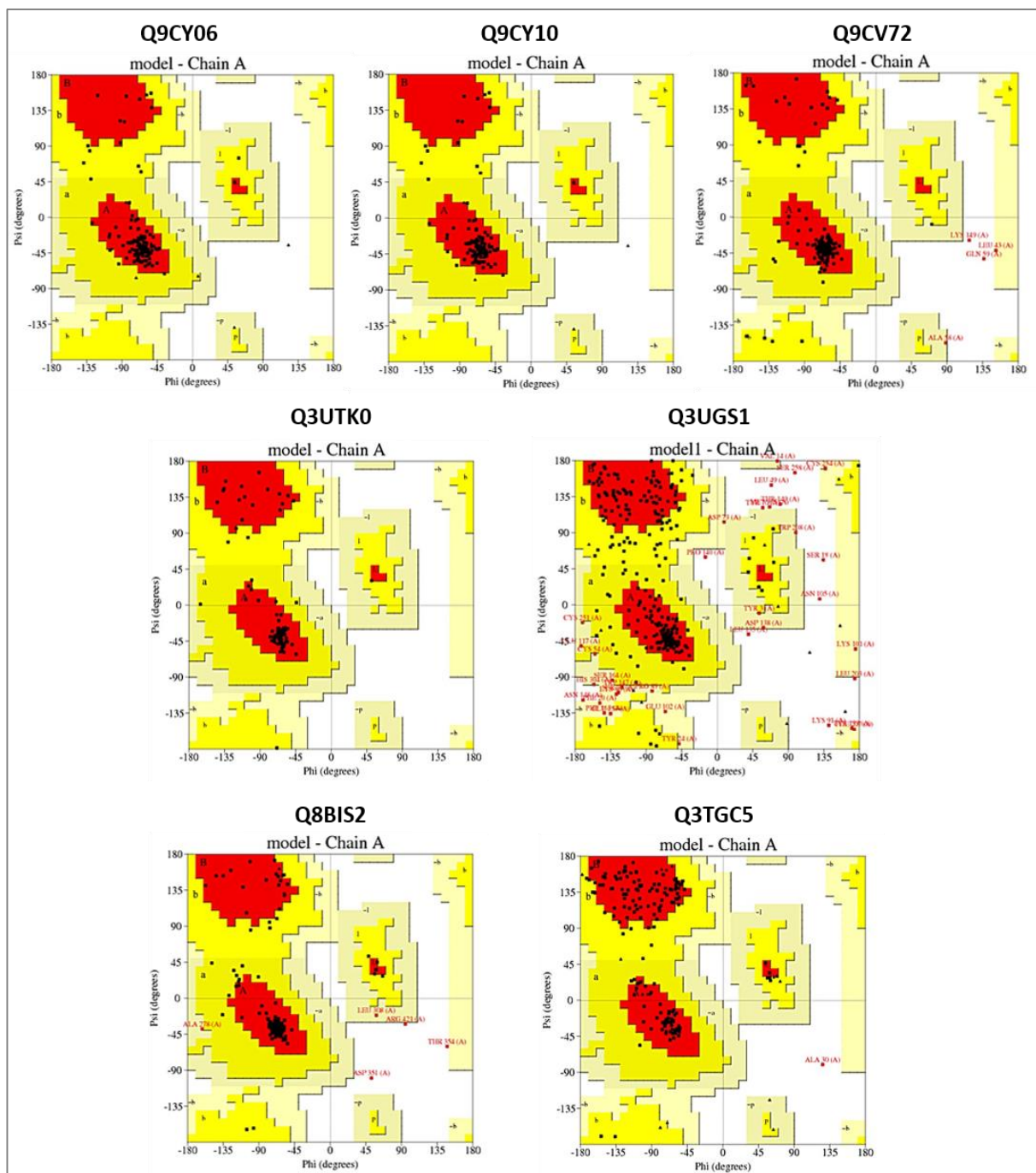


Figura 18. Gráficos de Ramachandran demonstrando o arranjo espacial estereoquímico dos resíduos de aa.

As funções foram inferidas através do 3d2GO Server, que infere uma potencial função através da estrutura tridimensional obtida e da homologia da sequência alvo com sequências já anotadas funcionalmente. O nível de confiança varia de 0 a 1 sendo 1 o mais confiável. A análise funcional revelou que a maioria das sequências estavam associadas a funções moleculares que envolvem ligação ou transporte (tabela 7). Esse achado é perfeitamente justificável uma vez que durante a amelogenese inúmeros íons e proteínas são secretados e/ou incorporados à matriz do esmalte em desenvolvimento.

Tabela 7. Funções inferidas para dos modelos de proteínas com base na classificação funcional do GO obtida através do 3d2GO.

Seq.	Termo GO	Descrição	Nível de confiança
Q9CY06	GO:0006810	Transport	0,99
	GO:0005506	Iron ion binding	0,99
Q9CY10	GO:0006810	Transport	0,98
	GO:0005506	Iron ion binding	0,98
Q9CV72	GO:0005515	Protein binding	0,73
Q3TGC5	GO:0032559	Adenyl ribonucleotide binding	0,91
Q3UTK0	GO:0005515	Protein binding	0,93
Q3UGS1	GO:0016491	Oxidoreductase activity	0,36
Q8BIS2	GO:0005515	Protein binding	0,47
	GO:0016020	Membrane	0,40

Um achado interessante foi que as sequências Q9CY06 e Q9CY10, que apresentam estruturas secundárias e terciárias bastante similares (figuras 19 e 20), foram ambas associadas ao termo *iron ion binding* (ligantes de ferro). Proteínas relacionadas a esta função interagem de maneira seletiva e não covalentemente com íons Fe. O Fe está ativamente envolvido em numerosas funções biológicas, e atua como um cofator para muitas proteínas, incluindo hemoglobinas, na ligação e transporte de oxigênio, catalases e peroxidases, no metabolismo do oxigênio, citocromos, na fosforilação oxidativa e transporte de elétrons (PANTOPOULOS; PORWAL; TARTAKOFF et al., 2012). Durante a amelogenese ocorre transporte ativo de íons e água para a matriz orgânica bem

como a remoção das proteínas da matriz, eventos que demandam alto consumo de energia e, conseqüentemente exigem aumento na produção de ATP através de fosforilação oxidativa nas mitocôndrias (OHSHIMA; MAEDA e TAKANO, 1998). É possível que essas sequências estejam envolvidas no carreamento e/ou metabolismo do Fe para auxiliar a produção de ATP.

Outro fator que deve ser considerado é que, apesar do esmalte ser formado principalmente por cristais de hidroxiapatita $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$, íons como magnésio (Mg^{2+}), carbonato (CO_3^{2-}), e F^- , podem afetar fortemente as suas propriedades, mesmo que em pequenas quantidades, tornando-o mais ou menos resistente. O mesmo acontece com o Fe, que quando incorporado no esmalte dentário fornece a condição pigmentada dos incisivos de roedores (HALSE e SELVIG, 1974; PINDBORG, 1953), e além disso, aumenta substancialmente a dureza do mesmo (GORDON; COHEN; MACRENARIS et al., 2015). Desse modo, é possível ainda que essas sequências auxiliem na incorporação deste metal no esmalte dentário, contribuindo para sua maior resistência.

Um fato que merece destaque é que a sequência Q9CY06 estava presente na matriz de secreção de ambas as linhagens, mas apenas na matriz de maturação da linhagem A/J, enquanto que a sequência Q9CY10, estava presente na matriz de secreção apenas da linhagem 129P3/J. Baseado nos dados inferidos, essas sequências poderiam conferir um esmalte com maior resistência, e como a linhagem A/J apresentou apenas a Q9CY06 durante a fase de secreção é possível que a presença concomitante da sequência Q9CY10 nos animais da linhagem 129P3/J seja uma maneira de melhorar a mineralização do esmalte nessa linhagem. Dessa forma, essas proteínas são prováveis candidatas para explicarem a susceptibilidade ou resistência à fluorose dentária, o que merece ser investigado em estudos futuros.

A sequência Q3TGC5 foi encontrada apenas na matriz de secreção da linhagem 129P3/J e foi associada ao termo *Adenyl ribonucleotide binding* e o modelo tridimensional obtido foi baseado na similaridade com uma proteína ligante de ATP (figura 21). Isso que indica que esta proteína hipotética pode interagir com nucleotídeos de adenina, e dessa maneira, pode atuar na produção

de energia. A sequência Q3UGS1 (figura 22) foi atribuída ao termo *Oxidoreductase activity*. As enzimas que apresentam essa função catalisam reações de oxirredução, ou seja, transferem elétrons de uma molécula (reduzora) para outra (oxidante) e, portanto, é provável que a Q3UGS1 também esteja envolvida na produção de energia, o que condiz com seu perfil de expressão, já que esta foi observada apenas no esmalte de secreção de ambas linhagens.

As sequências Q9CV72, Q3UTK0 e Q8BIS2 foram relacionadas com ao termo *protein binding* (ligante de proteína). Proteínas com esta função molecular interagem seletivamente e de forma não covalente com outra proteína ou complexo de proteínas (que podem incluir outras moléculas não proteicas).

O modelo tridimensional para sequência Q9CV72 (figura 23) teve como sequência molde a proteína *Endophilin-A1*, que pode atuar no recrutamento de outras proteínas para a membrana, ajudando na transdução de sinal. Já o modelo da Q3UTK0 (figura 24) foi baseado na proteína *Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 3*, uma citocina envolvida no recrutamento de mRNA para o ribossomo, sendo assim importante para a biossíntese de proteínas. Ambas as sequências foram encontradas na matriz de secreção de ambas linhagens, mas não na maturação, o que é perfeitamente compatível com a função inferida, já que durante a fase de secreção há um aumento significativo na síntese proteica.

Por fim, o modelo da sequência Q8BIS2 (figura 25) foi obtido da *LidA protein, substrate of the Dot/Icm system*, uma enzima recém caracterizada experimentalmente por cristalografia de raio-X cuja função ainda não está esclarecida. É interessante destacar que essa proteína foi encontrada tanto na fase de secreção quanto na fase de maturação e em ambas linhagens, indicando a possibilidade de essa proteína desempenhar um importante papel na amelogênese, e certamente pode ajudar a desvendar os mecanismos moleculares envolvidos na fluorose dentária.

Com base nos dados acima, podemos inferir que, com exceção da Q8BIS2 e talvez das Q9CY06 e Q9CY10, as sequências relatadas sejam de proteínas intracelulares (provenientes dos ameloblastos), e que atuam na sinalização e produção de energia durante a amelogênese. Resultados

semelhantes foram obtidos por Osmundsen e colaboradores (OSMUNDSEN; LANDIN; FROM et al., 2007) que, ao avaliar a expressão gênica global em germes dentários, encontraram inúmeros genes com expressão alterada relacionados principalmente ao metabolismo energético e divisão e crescimento celular. Por outro lado, a sequência Q8BIS2 pode ser uma proteína extracelular de matriz envolvida na degradação das proteínas da matriz orgânica do esmalte.

Os resultados obtidos da análise computacional das sequências não caracterizadas forneceram uma visão das características estruturais e funcionais das proteínas hipotéticas. Esses dados certamente ajudarão na caracterização experimental dessas proteínas, que por sua vez pode ajudar no entendimento nos mecanismos moleculares envolvidos na amelogênese e conseqüentemente ajudarem a entender as diferenças de resistência e susceptibilidade genética à fluorose dentária.

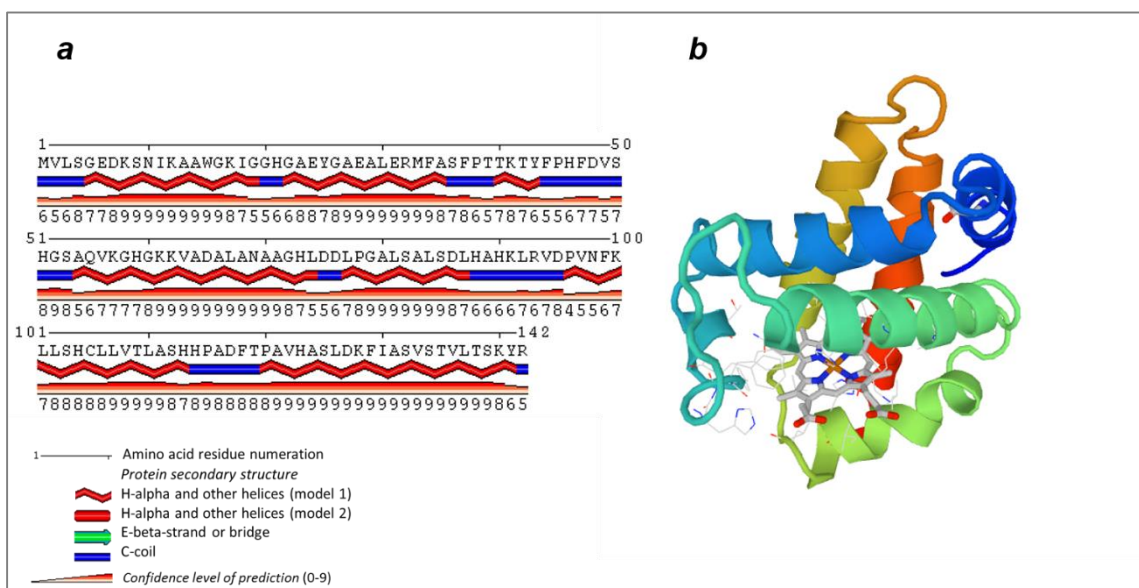


Figura 19. Modelos estruturais obtidos para a sequência Q9CY06. Em **a** estrutura secundária predita com base na sequência de aa e em **b** estrutura terciária elaborada com base na homologia.

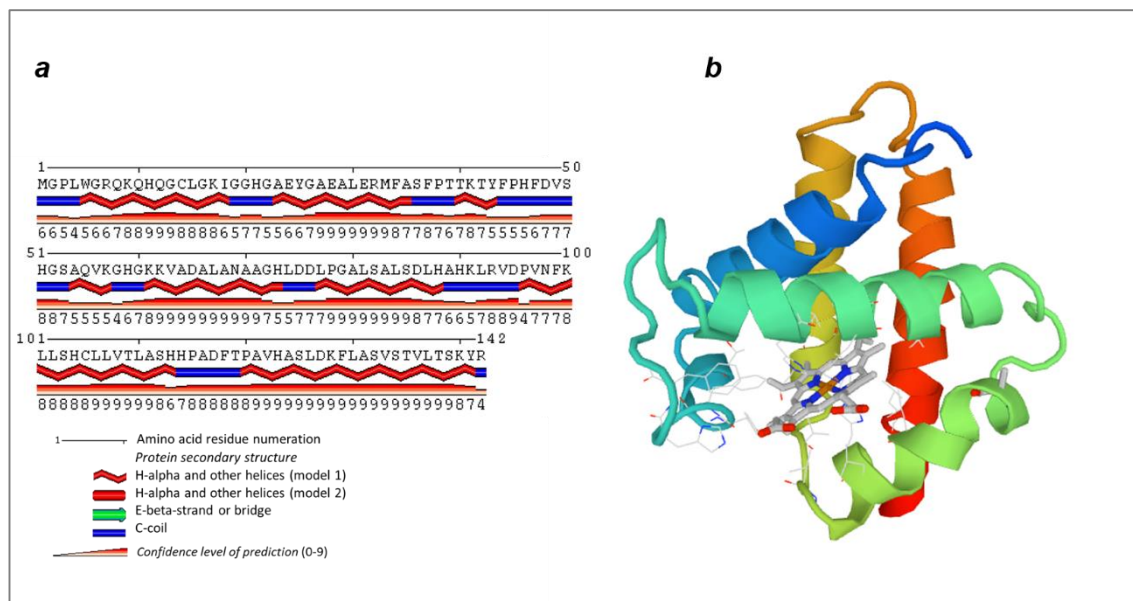


Figura 20. Modelos estruturais obtidos para a sequência Q9CY10. Em **a** estrutura secundária predita com base na sequência de aa e em **b** estrutura terciária elaborada com base na homologia.

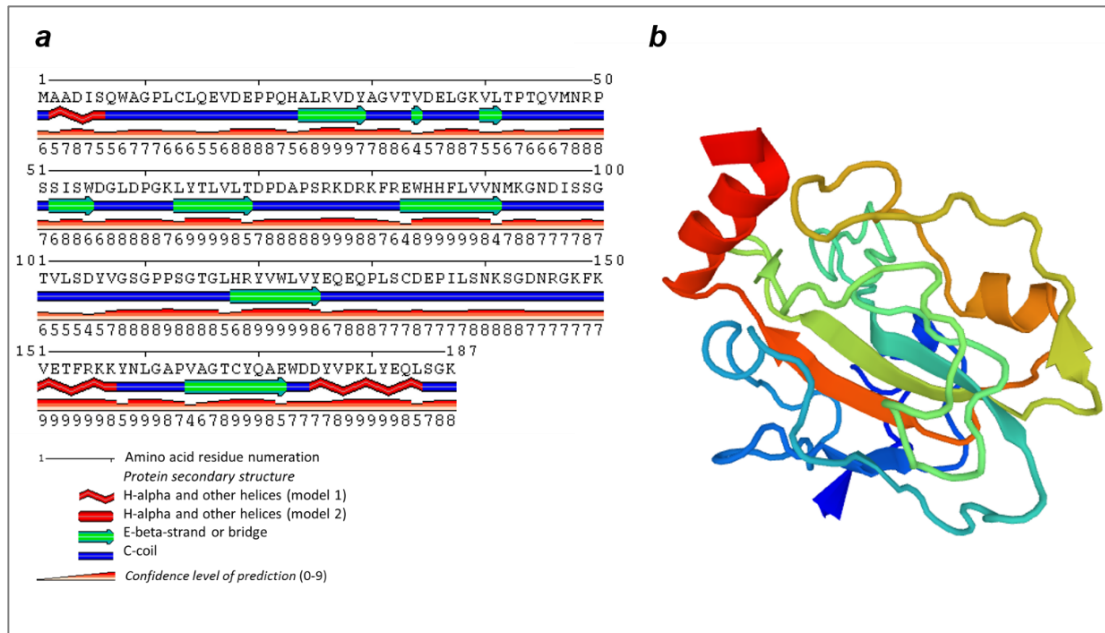


Figura 21. Modelos estruturais obtidos para a sequência Q3TGC5. Em **a** estrutura secundária predita com base na sequência de aa e em **b** estrutura terciária elaborada com base na homologia.

Conclusão

5 CONCLUSÃO

O presente estudo possibilitou caracterizar o perfil proteômico do esmalte de incisivos de camundongos das linhagens A/J e 129P3/J. Tal resultado forneceu novas perspectivas sobre o processo de biomineralização do esmalte, pois o perfil proteômico obtido incluiu proteínas que até então não eram associadas à amelogênese. Conclui-se assim, que a combinação das abordagens proteômicas 2D-PAGE e *shotgun* foi bastante eficaz na busca do proteoma do esmalte de roedores.

Referências Bibliográficas

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACIL, Y.;MOBASSERI, A. E.;WARNKE, P. H.;TERHEYDEN, H.;WILTFANG, J.;SPRINGER, I. Detection of mature collagen in human dental enamel. **Calcif Tissue Int**, 76, 2, 121-126, 2005.

ADAMCZAK, R.;POROLLO, A.;MELLER, J. Combining prediction of secondary structure and solvent accessibility in proteins. **Proteins**, 59, 3, 467-475, 2005.

AEBERSOLD, R.;GOODLETT, D. R. Mass spectrometry in proteomics. **Chem Rev**, 101, 2, 269-295, 2001.

AEBERSOLD, R.;MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics. **Nature**, 422, 6928, 198-207, 2003.

AL-HASHIMI, N.;SIRE, J. Y.;DELGADO, S. Evolutionary analysis of mammalian enamelin, the largest enamel protein, supports a crucial role for the 32-kDa peptide and reveals selective adaptation in rodents and primates. **J Mol Evol**, 69, 6, 635-656, 2009.

ALTSCHUL, S. F.;MADDEN, T. L.;SCHAFFER, A. A.;ZHANG, J.;ZHANG, Z.;MILLER, W.;LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res**, 25, 17, 3389-3402, 1997.

ESTADOS UNIDOS DA AMÉRICA. American Dental Association. **Fluoridation facts** Chicago, Illinois, , 2005.

ANGMAR-MANSSON, B.;ERICSSON, Y.;EKBERG, O. Plasma fluoride and enamel fluorosis. **Calcif Tissue Res**, 22, 1, 77-84, 1976.

ANGMAR-MANSSON, B.;WHITFORD, G. M. Enamel fluorosis related to plasma F levels in the rat. **Caries Res**, 18, 1, 25-32, 1984.

ANGMAR-MANSSON, B.;WHITFORD, G. M. Environmental and physiological factors affecting dental fluorosis. **J Dent Res**, 69 Spec No, 706-713; discussion 721, 1990.

AOBA, T.;FEJERSKOV, O. Dental fluorosis: chemistry and biology. **Crit Rev Oral Biol Med**, 13, 2, 155-170, 2002.

AOBA, T.;MORENO, E. C.;TANABE, T.;FUKAE, M. Effects of fluoride on matrix proteins and their properties in rat secretory enamel. **J Dent Res**, 69, 6, 1248-1255, 1990.

ARNOLD, K.;BORDOLI, L.;KOPP, J.;SCHWEDE, T. The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. **Bioinformatics**, 22, 2, 195-201, 2006.

ASHRAFI, S. H.;EISENMANN, D. R.;ZAKI, A. E.;LISS, R. Effect of fluoride and cobalt on forming enamel: scanning electron microscope and X-ray microanalysis study. **Scanning Microsc**, 2, 3, 1527-1534, 1988.

BABA, O.;TAKAHASHI, N.;TERASHIMA, T.;LI, W.;DENBESTEN, P. K.;TAKANO, Y. Expression of alternatively spliced RNA transcripts of amelogenin gene exons 8 and 9 and its end products in the rat incisor. **J Histochem Cytochem**, 50, 9, 1229-1236, 2002.

BARTLETT, J. D. Dental enamel development: proteinases and their enamel matrix substrates. **ISRN Dent**, 2013, 684607, 2013.

BARTLETT, J. D.;BALL, R. L.;KAWAI, T.;TYE, C. E.;TSUCHIYA, M.;SIMMER, J. P. Origin, splicing, and expression of rodent amelogenin exon 8. **J Dent Res**, 85, 10, 894-899, 2006.

BARTLETT, J. D.;BENIASH, E.;LEE, D. H.;SMITH, C. E. Decreased mineral content in MMP-20 null mouse enamel is prominent during the maturation stage. **J Dent Res**, 83, 12, 909-913, 2004.

BARTLETT, J. D.;SIMMER, J. P.;XUE, J.;MARGOLIS, H. C.;MORENO, E. C. Molecular cloning and mRNA tissue distribution of a novel matrix metalloproteinase isolated from porcine enamel organ. **Gene**, 183, 1-2, 123-128, 1996.

BARTLETT, J. D.;SKOBE, Z.;NANCI, A.;SMITH, C. E. Matrix metalloproteinase 20 promotes a smooth enamel surface, a strong dentino-enamel junction, and a decussating enamel rod pattern. **Eur J Oral Sci**, 119 Suppl 1, 199-205, 2011.

BERDAL, A.;HOTTON, D.;SAFFAR, J. L.;THOMASSET, M.;NANCI, A. Calbindin-D9k and calbindin-D28k expression in rat mineralized tissues in vivo. **J Bone Miner Res**, 11, 6, 768-779, 1996.

BINDEA, G.;MLECNIK, B.;HACKL, H.;CHAROENTONG, P.;TOSOLINI, M.;KIRILOVSKY, A.;FRIDMAN, W. H.;PAGES, F.;TRAJANOSKI, Z.;GALON, J. ClueGO: a Cytoscape plug-in to decipher functionally grouped gene ontology and pathway annotation networks. **Bioinformatics**, 25, 8, 1091-1093, 2009.

BORDOLI, L.;KIEFER, F.;ARNOLD, K.;BENKERT, P.;BATTEY, J.;SCHWEDE, T. Protein structure homology modeling using SWISS-MODEL workspace. **Nat Protoc**, 4, 1, 1-13, 2009.

BOWIE, J. U.;LUTHY, R.;EISENBERG, D. A method to identify protein sequences that fold into a known three-dimensional structure. **Science**, 253, 5016, 164-170, 1991.

BRONCKERS, A. L.;LYARUU, D. M.;BERVOETS, T. J.;WOLTGENS, J. H. Fluoride enhances intracellular degradation of amelogenins during secretory phase of

amelogenesis of hamster teeth in organ culture. **Connect Tissue Res**, 43, 2-3, 456-465, 2002.

BRONCKERS, A. L.;LYARUU, D. M.;DENBESTEN, P. K. The impact of fluoride on ameloblasts and the mechanisms of enamel fluorosis. **J Dent Res**, 88, 10, 877-893, 2009.

BRONCKERS, A. L.;WOLTGENS, J. H. Short-term effects of fluoride on biosynthesis of enamel-matrix proteins and dentine collagens and on mineralization during hamster tooth-germ development in organ culture. **Arch Oral Biol**, 30, 2, 181-191, 1985.

BUZALAF, M. A.;LEVY, S. M. Fluoride intake of children: considerations for dental caries and dental fluorosis. **Monogr Oral Sci**, 22, 1-19, 2011.

CANAS, B.;LOPEZ-FERRER, D.;RAMOS-FERNANDEZ, A.;CAMAFEITA, E.;CALVO, E. Mass spectrometry technologies for proteomics. **Brief Funct Genomic Proteomic**, 4, 4, 295-320, 2006.

CANDIANO, G.;BRUSCHI, M.;MUSANTE, L.;SANTUCCI, L.;GHIGGERI, G. M.;CARNEMOLLA, B.;ORECCHIA, P.;ZARDI, L.;RIGHETTI, P. G. Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. **Electrophoresis**, 25, 9, 1327-1333, 2004.

CARVALHO, J. G.;LEITE, A. L.;YAN, D.;EVERETT, E. T.;WHITFORD, G. M.;BUZALAF, M. A. Influence of genetic background on fluoride metabolism in mice. **J Dent Res**, 88, 11, 1054-1058, 2009.

CATERINA, J. J.;SKOBE, Z.;SHI, J.;DING, Y.;SIMMER, J. P.;BIRKEDAL-HANSEN, H.;BARTLETT, J. D. Enamelysin (matrix metalloproteinase 20)-deficient mice display an amelogenesis imperfecta phenotype. **J Biol Chem**, 277, 51, 49598-49604, 2002.

CHAPMAN, V. M.;KEITZ, B. T.;DISTECHE, C. M.;LAU, E. C.;SNEAD, M. L. Linkage of amelogenin (Amel) to the distal portion of the mouse X chromosome. **Genomics**, 10, 1, 23-28, 1991.

CHARONE, S. **Análise proteômica da matriz do esmalte nos estágios de secreção e maturação em camundongos susceptíveis ou resistentes à fluorose dentária, expostos cronicamente ao fluoreto através da água de beber**. 264 Doutorado -, Faculdade de Odontologia de Bauru, Bauru, 2013.

DASS, C. **Fundamentals of contemporary mass spectrometry**. Hoboken: Wiley-interscience, 2007.

DELAK, K.;HARCUP, C.;LAKSHMINARAYANAN, R.;SUN, Z.;FAN, Y.;MORADIAN-OLDAK, J.;EVANS, J. S. The tooth enamel protein, porcine amelogenin, is an intrinsically disordered protein with an extended molecular configuration in the monomeric form. **Biochemistry**, 48, 10, 2272-2281, 2009.

DEN BESTEN, P. K. Effects of fluoride on protein secretion and removal during enamel development in the rat. **J Dent Res**, 65, 10, 1272-1277, 1986.

DENBESTEN, P. K.;CRENSHAW, M. A.;WILSON, M. H. Changes in the fluoride-induced modulation of maturation stage ameloblasts of rats. **J Dent Res**, 64, 12, 1365-1370, 1985.

DENBESTEN, P. K.;LI, W. Chronic fluoride toxicity: dental fluorosis. **Monogr Oral Sci**, 22, 81-96, 2011.

DENECKE, B.;GRABER, S.;SCHAFER, C.;HEISS, A.;WOLTJE, M.;JAHNEN-DECHENT, W. Tissue distribution and activity testing suggest a similar but not identical function of fetuin-B and fetuin-A. **Biochem J**, 376, Pt 1, 135-145, 2003.

DESLER, C.;DURHUUS, J. A.;RASMUSSEN, L. J. Genome-wide screens for expressed hypothetical proteins. **Methods Mol Biol**, 815, 25-38, 2012.

DOUCETTE, A. A.;TRAN, J. C.;WALL, M. J.;FITZSIMMONS, S. Intact proteome fractionation strategies compatible with mass spectrometry. **Expert Rev Proteomics**, 8, 6, 787-800, 2011.

DROGEMULLER, C.;BECKER, D.;BRUNNER, A.;HAASE, B.;KIRCHER, P.;SEELIGER, F.;FEHR, M.;BAUMANN, U.;LINDBLAD-TOH, K.;LEEB, T. A missense mutation in the SERPINH1 gene in Dachshunds with osteogenesis imperfecta. **PLoS Genet**, 5, 7, e1000579, 2009.

EASTOE, J. E. The Amino Acid Composition of Proteins from the Oral Tissues. II. The Matrix Proteins in Dentine and Enamel from Developing Human Deciduous Teeth. **Arch Oral Biol**, 8, 633-652, 1963.

EISENBERG, D.;LUTHY, R.;BOWIE, J. U. VERIFY3D: assessment of protein models with three-dimensional profiles. **Methods Enzymol**, 277, 396-404, 1997.

EKSTRAND, J.;SPAK, C. J.;EHRNEBO, M. Renal clearance of fluoride in a steady state condition in man: influence of urinary flow and pH changes by diet. **Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)**, 50, 5, 321-325, 1982.

ESWAR, N.;WEBB, B.;MARTI-RENOM, M. A.;MADHUSUDHAN, M. S.;ERAMIAN, D.;SHEN, M. Y.;PIEPER, U.;SALI, A. Comparative protein structure modeling using MODELLER. **Curr Protoc Protein Sci**, Chapter 2, Unit 2 9, 2007.

EVERETT, E. T. Fluoride's effects on the formation of teeth and bones, and the influence of genetics. **J Dent Res**, 90, 5, 552-560, 2011.

EVERETT, E. T.;MCHENRY, M. A.;REYNOLDS, N.;EGGERTSSON, H.;SULLIVAN, J.;KANTMANN, C.;MARTINEZ-MIER, E. A.;WARRICK, J. M.;STOOKEY, G. K. Dental fluorosis: variability among different inbred mouse strains. **J Dent Res**, 81, 11, 794-798, 2002.

- EVERETT, E. T.;YAN, D.;WEAVER, M.;LIU, L.;FOROUD, T.;MARTINEZ-MIER, E. A. Detection of dental fluorosis-associated quantitative trait Loci on mouse chromosomes 2 and 11. **Cells Tissues Organs**, 189, 1-4, 212-218, 2009.
- EVERETT, E. T.;YIN, Z.;YAN, D.;ZOU, F. Fine mapping of dental fluorosis quantitative trait loci in mice. **Eur J Oral Sci**, 119 Suppl 1, 8-12, 2011.
- FENG, J.;MCDANIEL, J. S.;CHUANG, H. H.;HUANG, O.;RAKIAN, A.;XU, X.;STEFFENSEN, B.;DONLY, K. J.;MACDOUGALL, M.;CHEN, S. Binding of amelogenin to MMP-9 and their co-expression in developing mouse teeth. **J Mol Histol**, 43, 5, 473-485, 2012.
- FENN, J. B.;MANN, M.;MENG, C. K.;WONG, S. F.;WHITEHOUSE, C. M. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. **Science**, 246, 4926, 64-71, 1989.
- FINCHAM, A. G.;MORADIAN-OLDAK, J. Recent advances in amelogenin biochemistry. **Connect Tissue Res**, 32, 1-4, 119-124, 1995.
- FINCHAM, A. G.;MORADIAN-OLDAK, J.;SIMMER, J. P. The structural biology of the developing dental enamel matrix. **J Struct Biol**, 126, 3, 270-299, 1999.
- FUKAE, M.;TANABE, T. Nonamelogenin components of porcine enamel in the protein fraction free from the enamel crystals. **Calcif Tissue Int**, 40, 5, 286-293, 1987.
- FUKAE, M.;TANABE, T. Degradation of enamel matrix proteins in porcine secretory enamel. **Connect Tissue Res**, 39, 1-3, 123-129; discussion 141-129, 1998.
- FUKAE, M.;TANABE, T.;MURAKAMI, C.;DOHI, N.;UCHIDA, T.;SHIMIZU, M. Primary structure of the porcine 89-kDa enamelin. **Adv Dent Res**, 10, 2, 111-118, 1996.
- FUKAE, M.;TANABE, T.;UCHIDA, T.;LEE, S. K.;RYU, O. H.;MURAKAMI, C.;WAKIDA, K.;SIMMER, J. P.;YAMADA, Y.;BARTLETT, J. D. Enamelysin (matrix metalloproteinase-20): localization in the developing tooth and effects of pH and calcium on amelogenin hydrolysis. **J Dent Res**, 77, 8, 1580-1588, 1998.
- FUKAE, M.;TANABE, T.;UCHIDA, T.;YAMAKOSHI, Y.;SHIMIZU, M. Enamelins in the newly formed bovine enamel. **Calcif Tissue Int**, 53, 4, 257-261, 1993.
- FUKUMOTO, E.;YUASA, K.;YAMADA, A.;FUKUMOTO, S. The stage specific expression of annexin2 in developing ameloblasts. **J. Dent. Res**, 84, Abstract#3368, 2005.
- FUKUMOTO, S.;KIBA, T.;HALL, B.;IEHARA, N.;NAKAMURA, T.;LONGENECKER, G.;KREBSBACH, P. H.;NANCI, A.;KULKARNI, A. B.;YAMADA, Y. Ameloblastin is a cell adhesion molecule required for maintaining the differentiation state of ameloblasts. **J Cell Biol**, 167, 5, 973-983, 2004.
- GAO, Y.;WANG, W.;SUN, Y.;ZHANG, J.;LI, D.;WEI, Y.;HAN, T. Distribution of amelotin in mouse tooth development. **Anat Rec (Hoboken)**, 293, 1, 135-140, 2010.

GASTEIGER, E.;HOOGLAND, C.;GATTIKER, A.;DUVAUD, S.;WILKINS, M. R.;APPEL, R. D.;BAIROCH, A. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. John, M. W. **The Proteomics Protocols Handbook** Humana Press, 2005. 571-607.

GERKE, V.;MOSS, S. E. Annexins: from structure to function. **Physiol Rev**, 82, 2, 331-371, 2002.

GIBSON, C. W.;GOLUB, E.;DING, W. D.;SHIMOKAWA, H.;YOUNG, M.;TERMINE, J.;ROSENBLOOM, J. Identification of the leucine-rich amelogenin peptide (LRAP) as the translation product of an alternatively spliced transcript. **Biochem Biophys Res Commun**, 174, 3, 1306-1312, 1991.

GIBSON, C. W.;LI, Y.;SUGGS, C.;KUEHL, M. A.;PUGACH, M. K.;KULKARNI, A. B.;WRIGHT, J. T. Rescue of the murine amelogenin null phenotype with two amelogenin transgenes. **Eur J Oral Sci**, 119 Suppl 1, 70-74, 2011.

GIBSON, C. W.;YUAN, Z. A.;HALL, B.;LONGENECKER, G.;CHEN, E.;THYAGARAJAN, T.;SREENATH, T.;WRIGHT, J. T.;DECKER, S.;PIDDINGTON, R.;HARRISON, G.;KULKARNI, A. B. Amelogenin-deficient mice display an amelogenesis imperfecta phenotype. **J Biol Chem**, 276, 34, 31871-31875, 2001.

GIDDINGS, J. C. Two-dimensional separations: concept and promise. **Anal Chem**, 56, 12, 1258A-1260A, 1262A, 1264A passim, 1984.

GOLDBERG, M.;FEINBERG, J.;RAINTEAU, D.;LECOLLE, S.;KAETZEL, M. A.;DEDMAN, J. R.;WEINMAN, S. Annexins I-VI in secretory ameloblasts and odontoblasts of rat incisor. **J Biol Buccale**, 18, 4, 289-298, 1990.

GORDON, L. M.;COHEN, M. J.;MACRENARIS, K. W.;PASTERIS, J. D.;SEDA, T.;JOESTER, D. Dental materials. Amorphous intergranular phases control the properties of rodent tooth enamel. **Science**, 347, 6223, 746-750, 2015.

GURUPRASAD, K.;REDDY, B. V.;PANDIT, M. W. Correlation between stability of a protein and its dipeptide composition: a novel approach for predicting in vivo stability of a protein from its primary sequence. **Protein Eng**, 4, 2, 155-161, 1990.

HALSE, A.;SELVIG, K. A. Incorporation of iron in rat incisor enamel. **Scand J Dent Res**, 82, 1, 47-56, 1974.

HART, P. S.;HART, T. C.;SIMMER, J. P.;WRIGHT, J. T. A nomenclature for X-linked amelogenesis imperfecta. **Arch Oral Biol**, 47, 4, 255-260, 2002.

HOTTON, D.;DAVIDEAU, J. L.;BERNAUDIN, J. F.;BERDAL, A. In situ hybridization of calbindin-D 28 k transcripts in undecalcified sections of the rat continuously erupting incisor. **Connect Tissue Res**, 32, 1-4, 137-143, 1995.

HU, C. C.;FUKAE, M.;UCHIDA, T.;QIAN, Q.;ZHANG, C. H.;RYU, O. H.;TANABE, T.;YAMAKOSHI, Y.;MURAKAMI, C.;DOHI, N.;SHIMIZU, M.;SIMMER, J. P. Cloning and

characterization of porcine enamelin mRNAs. **J Dent Res**, 76, 11, 1720-1729, 1997.

HU, C. C.;HART, T. C.;DUPONT, B. R.;CHEN, J. J.;SUN, X.;QIAN, Q.;ZHANG, C. H.;JIANG, H.;MATTERN, V. L.;WRIGHT, J. T.;SIMMER, J. P. Cloning human enamelin cDNA, chromosomal localization, and analysis of expression during tooth development. **J Dent Res**, 79, 4, 912-919, 2000.

HU, J. C.;CHUN, Y. H.;AL HAZZAZZI, T.;SIMMER, J. P. Enamel formation and amelogenesis imperfecta. **Cells Tissues Organs**, 186, 1, 78-85, 2007.

HU, J. C.;HU, Y.;SMITH, C. E.;MCKEE, M. D.;WRIGHT, J. T.;YAMAKOSHI, Y.;PAPAGERAKIS, P.;HUNTER, G. K.;FENG, J. Q.;YAMAKOSHI, F.;SIMMER, J. P. Enamel defects and ameloblast-specific expression in Enam knock-out/lacZ knock-in mice. **J Biol Chem**, 283, 16, 10858-10871, 2008.

HUANG, D. W.;SHERMAN, B. T.;TAN, Q.;COLLINS, J. R.;ALVORD, W. G.;ROAYAEI, J.;STEPHENS, R.;BASELER, M. W.;LANE, H. C.;LEMPICKI, R. A. The DAVID Gene Functional Classification Tool: a novel biological module-centric algorithm to functionally analyze large gene lists. **Genome Biol**, 8, 9, R183, 2007.

HUANG, H.;BA, Y.;CUI, L.;CHENG, X.;ZHU, J.;ZHANG, Y.;YAN, P.;ZHU, C.;KILFOY, B.;ZHANG, Y. COL1A2 gene polymorphisms (Pvu II and Rsa I), serum calciotropic hormone levels, and dental fluorosis. **Community Dent Oral Epidemiol**, 36, 6, 517-522, 2008.

HYNEK, R.;SVENSSON, B.;JENSEN, O. N.;BARKHOLT, V.;FINNIE, C. Enrichment and identification of integral membrane proteins from barley aleurone layers by reversed-phase chromatography, SDS-PAGE, and LC-MS/MS. **J Proteome Res**, 5, 11, 3105-3113, 2006.

IWASAKI, K.;BAJENOVA, E.;SOMOGYI-GANSS, E.;MILLER, M.;NGUYEN, V.;NOURKEYHANI, H.;GAO, Y.;WENDEL, M.;GANSS, B. Amelotin--a Novel Secreted, Ameloblast-specific Protein. **J Dent Res**, 84, 12, 1127-1132, 2005.

JAHNEN-DECHENT, W.;SCHINKE, T.;TRINDL, A.;MULLER-ESTERL, W.;SABLITZKY, F.;KAISER, S.;BLESSING, M. Cloning and targeted deletion of the mouse fetuin gene. **J Biol Chem**, 272, 50, 31496-31503, 1997.

JEON, U. S. Kidney and calcium homeostasis. **Electrolyte Blood Press**, 6, 2, 68-76, 2008.

KALABAY, L.;CSEH, K.;PAJOR, A.;BARANYI, E.;CSAKANY, G. M.;MELCZER, Z.;SPEER, G.;KOVACS, M.;SILLER, G.;KARADI, I.;WINKLER, G. Correlation of maternal serum fetuin/alpha2-HS-glycoprotein concentration with maternal insulin resistance and anthropometric parameters of neonates in normal pregnancy and gestational diabetes. **Eur J Endocrinol**, 147, 2, 243-248, 2002.

KARAS, M.;HILLENKAMP, F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. **Anal Chem**, 60, 20, 2299-2301, 1988.

KATZ, E. P.;SEYER, J.;LEVINE, P. T.;GLIMCHER, M. J. The comparative biochemistry of the organic matrix of developing enamel--II. Ultracentrifugal and electrophoretic characterization of proteins soluble at neutral pH. **Arch Oral Biol**, 14, 5, 533-539, 1969.

KHAN, A.;MOOLA, M. H.;CLEATON-JONES, P. Global trends in dental fluorosis from 1980 to 2000: a systematic review. **SADJ**, 60, 10, 418-421, 2005.

KIM, J. W.;SIMMER, J. P.;HU, Y. Y.;LIN, B. P.;BOYD, C.;WRIGHT, J. T.;YAMADA, C. J.;RAYES, S. K.;FEIGAL, R. J.;HU, J. C. Amelogenin p.M1T and p.W4S mutations underlying hypoplastic X-linked amelogenesis imperfecta. **J Dent Res**, 83, 5, 378-383, 2004.

KLOSE, J. Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. **Humangenetik**, 26, 3, 231-243, 1975.

KRAMER-ALBERS, E. M.;BRETZ, N.;TENZER, S.;WINTERSTEIN, C.;MOBIUS, W.;BERGER, H.;NAVE, K. A.;SCHILD, H.;TROTTER, J. Oligodendrocytes secrete exosomes containing major myelin and stress-protective proteins: Trophic support for axons? **Proteomics Clin Appl**, 1, 11, 1446-1461, 2007.

KUBOTA, K.;LEE, D. H.;TSUCHIYA, M.;YOUNG, C. S.;EVERETT, E. T.;MARTINEZ-MIER, E. A.;SNEAD, M. L.;NGUYEN, L.;URANO, F.;BARTLETT, J. D. Fluoride induces endoplasmic reticulum stress in ameloblasts responsible for dental enamel formation. **J Biol Chem**, 280, 24, 23194-23202, 2005.

KURKINEN, M.;TAYLOR, A.;GARRELS, J. I.;HOGAN, B. L. Cell surface-associated proteins which bind native type IV collagen or gelatin. **J Biol Chem**, 259, 9, 5915-5922, 1984.

KWAK, S. Y.;WIEDEMANN-BIDLACK, F. B.;BENIASH, E.;YAMAKOSHI, Y.;SIMMER, J. P.;LITMAN, A.;MARGOLIS, H. C. Role of 20-kDa amelogenin (P148) phosphorylation in calcium phosphate formation in vitro. **J Biol Chem**, 284, 28, 18972-18979, 2009.

LACRUZ, R. S.;SMITH, C. E.;MOFFATT, P.;CHANG, E. H.;BROMAGE, T. G.;BRINGAS, P., JR.;NANCI, A.;BANIWAL, S. K.;ZABNER, J.;WELSH, M. J.;KURTZ, I.;PAINE, M. L. Requirements for ion and solute transport, and pH regulation during enamel maturation. **J Cell Physiol**, 227, 4, 1776-1785, 2012.

LACRUZ, R. S.;SMITH, C. E.;SMITH, S. M.;HU, P.;BRINGAS, P., JR.;SAHIN-TOTH, M.;MORADIAN-OLDAK, J.;PAINE, M. L. Chymotrypsin C (caldecrin) is associated with enamel development. **J Dent Res**, 90, 10, 1228-1233, 2011.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, 227, 5259, 680-685, 1970.

LAKSHMINARAYANAN, R.;YOON, I.;HEGDE, B. G.;FAN, D.;DU, C.;MORADIAN-OLDAK, J. Analysis of secondary structure and self-assembly of amelogenin by variable

temperature circular dichroism and isothermal titration calorimetry. **Proteins**, 76, 3, 560-569, 2009.

LASKOWSKI, R. A.;MACARTHUR, M. W.;MOSS, D. S.;THORNTON, J. M. Procheck - a Program to Check the Stereochemical Quality of Protein Structures. **Journal of Applied Crystallography**, 26, 283-291, 1993.

LAU, E. C.;MOHANDAS, T. K.;SHAPIRO, L. J.;SLAVKIN, H. C.;SNEAD, M. L. Human and mouse amelogenin gene loci are on the sex chromosomes. **Genomics**, 4, 2, 162-168, 1989.

LAU, E. C.;SIMMER, J. P.;BRINGAS, P., JR.;HSU, D. D.;HU, C. C.;ZEICHNER-DAVID, M.;THIEMANN, F.;SNEAD, M. L.;SLAVKIN, H. C.;FINCHAM, A. G. Alternative splicing of the mouse amelogenin primary RNA transcript contributes to amelogenin heterogeneity. **Biochem Biophys Res Commun**, 188, 3, 1253-1260, 1992.

LEITE, A. L. **Análise proteômica em rim de ratos submetidos à exposição aguda ao flúor**. 177 Mestrado -, Faculdade de Odontologia de Bauru, Bauru, 2010.

LINK, A. J.;ENG, J.;SCHIELTZ, D. M.;CARMACK, E.;MIZE, G. J.;MORRIS, D. R.;GARVIK, B. M.;YATES, J. R., 3RD. Direct analysis of protein complexes using mass spectrometry. **Nat Biotechnol**, 17, 7, 676-682, 1999.

LUTHY, R.;BOWIE, J. U.;EISENBERG, D. Assessment of protein models with three-dimensional profiles. **Nature**, 356, 6364, 83-85, 1992.

MANN, M.;HENDRICKSON, R. C.;PANDEY, A. Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry. **Annu Rev Biochem**, 70, 437-473, 2001.

MARTI-RENOM, M. A.;STUART, A. C.;FISER, A.;SANCHEZ, R.;MELO, F.;SALI, A. Comparative protein structure modeling of genes and genomes. **Annu Rev Biophys Biomol Struct**, 29, 291-325, 2000.

MASUYA, H.;SHIMIZU, K.;SEZUTSU, H.;SAKURABA, Y.;NAGANO, J.;SHIMIZU, A.;FUJIMOTO, N.;KAWAI, A.;MIURA, I.;KANEDA, H.;KOBAYASHI, K.;ISHIJIMA, J.;MAEDA, T.;GONDO, Y.;NODA, T.;WAKANA, S.;SHIROISHI, T. Enamelin (Enam) is essential for amelogenesis: ENU-induced mouse mutants as models for different clinical subtypes of human amelogenesis imperfecta (AI). **Hum Mol Genet**, 14, 5, 575-583, 2005.

MATSUO, S.;INAI, T.;KURISU, K.;KIYOMIYA, K.;KUREBE, M. Influence of fluoride on secretory pathway of the secretory ameloblast in rat incisor tooth germs exposed to sodium fluoride. **Arch Toxicol**, 70, 7, 420-429, 1996.

MCKEE, M. D.;ZEROUNIAN, C.;MARTINEAU-DOIZE, B.;WARSHAWSKY, H. Specific binding sites for transferrin on ameloblasts of the enamel maturation zone in the rat incisor. **Anat Rec**, 218, 2, 123-127, 1987.

MECHANIC, G. L.;KATZ, E. P.;GLIMCHER, M. J. The Sephadex gel filtration characteristics of the neutral soluble proteins of embryonic bovine enamel. **Biochim Biophys Acta**, 133, 1, 97-113, 1967.

MOFFATT, P.;SMITH, C. E.;ST-ARNAUD, R.;SIMMONS, D.;WRIGHT, J. T.;NANCI, A. Cloning of rat amelotin and localization of the protein to the basal lamina of maturation stage ameloblasts and junctional epithelium. **Biochem J**, 399, 1, 37-46, 2006.

MOLL, M.;KAVRAKI, L. E. Matching of structural motifs using hashing on residue labels and geometric filtering for protein function prediction. **Comput Syst Bioinformatics Conf**, 7, 157-168, 2008.

MOLLER, I. J. Fluorides and dental fluorosis. **Int Dent J**, 32, 2, 135-147, 1982.

MONSOUR, P. A.;HARBROW, D. J.;WARSHAWSKY, H. Effects of acute doses of sodium fluoride on the morphology and the detectable calcium associated with secretory ameloblasts in rat incisors. **J Histochem Cytochem**, 37, 4, 463-471, 1989.

MORADIAN-OLDAK, J. Protein-mediated enamel mineralization. **Front Biosci (Landmark Ed)**, 17, 1996-2023, 2012.

MORADIAN-OLDAK, J.;LAKSHMINARAYANAN, R. Intrinsic disorder in amelogenin. Goldberg, M. **Amelogenins: multifaceted proteins for dental and bone formation and repair** Duai: Bentham Books LTD, 2010.

MORITZ, R. L.;CLIPPINGDALE, A. B.;KAPP, E. A.;EDDES, J. S.;JI, H.;GILBERT, S.;CONNOLLY, L. M.;SIMPSON, R. J. Application of 2-D free-flow electrophoresis/RP-HPLC for proteomic analysis of human plasma depleted of multi high-abundance proteins. **Proteomics**, 5, 13, 3402-3413, 2005.

MURAKAMI, C.;DOHI, N.;FUKAE, M.;TANABE, T.;YAMAKOSHI, Y.;WAKIDA, K.;SATODA, T.;TAKAHASHI, O.;SHIMIZU, M.;RYU, O. H.;SIMMER, J. P.;UCHIDA, T. Immunochemical and immunohistochemical study of the 27- and 29-kDa calcium-binding proteins and related proteins in the porcine tooth germ. **Histochem Cell Biol**, 107, 6, 485-494, 1997.

NAGANO, T.;KAKEGAWA, A.;YAMAKOSHI, Y.;TSUCHIYA, S.;HU, J. C.;GOMI, K.;ARAI, T.;BARTLETT, J. D.;SIMMER, J. P. Mmp-20 and Klk4 cleavage site preferences for amelogenin sequences. **J Dent Res**, 88, 9, 823-828, 2009.

NANCI, A. **Ten Cate's Oral Histology: Development, Structure, and Function**. Elsevier, 2012. 122-164.

NELSON, D. L.;COX, M. M. **Lehninger princípios de bioquímica**. 3a ed. São Paulo: Sarvier, 2002.

O'FARRELL, P. H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. **J Biol Chem**, 250, 10, 4007-4021, 1975.

- OHSHIMA, H.;MAEDA, T.;TAKANO, Y. Cytochrome oxidase activity in the enamel organ during amelogenesis in rat incisors. **Anat Rec**, 252, 4, 519-531, 1998.
- ORCHARD, S. Molecular interaction databases. **Proteomics**, 12, 10, 1656-1662, 2012.
- OSMUNDSEN, H.;LANDIN, M. A.;FROM, S. H.;KOLLTVEIT, K. M.;RISNES, S. Changes in gene-expression during development of the murine molar tooth germ. **Arch Oral Biol**, 52, 9, 803-813, 2007.
- PANDEY, A.;MANN, M. Proteomics to study genes and genomes. **Nature**, 405, 6788, 837-846, 2000.
- PANTOPOULOS, K.;PORWAL, S. K.;TARTAKOFF, A.;DEVIREDDY, L. Mechanisms of mammalian iron homeostasis. **Biochemistry**, 51, 29, 5705-5724, 2012.
- PENDRYS, D. G.;STAMM, J. W. Relationship of total fluoride intake to beneficial effects and enamel fluorosis. **J Dent Res**, 69 Spec No, 529-538; discussion 556-527, 1990.
- PINDBORG, J. J. The pigmentation of the rat incisor as an index of metabolic disturbances. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, 6, 6, 780-789, 1953.
- PORTO, I. M.;LINE, S. R.;LAURE, H. J.;GERLACH, R. F. Comparison of three methods for enamel protein extraction in different developmental phases of rat lower incisors. **Eur J Oral Sci**, 114 Suppl 1, 272-275; discussion 285-276, 382, 2006.
- RAMACHANDRAN, G. N.;RAMAKRISHNAN, C.;SASISEKHARAN, V. Stereochemistry of polypeptide chain configurations. **J Mol Biol**, 7, 95-99, 1963.
- REINDERS, J.;SICKMANN, A. **Proteomics: Methods and protocols**. New York: Humana Press, 2002. 71-72.
- REITH, E. J.;BOYDE, A. Autoradiographic evidence of cyclical entry of calcium into maturing enamel of the rat incisor tooth. **Arch Oral Biol**, 26, 12, 983-987, 1981.
- ROBINSON, C.;HILLER, C. R.;WEATHERELL, J. A. Uptake of ³²P-labelled phosphate into developing rat incisor enamel. **Calcif Tissue Res**, 15, 2, 143-152, 1974.
- ROGERS, S.;GIROLAMI, M.;KOLCH, W.;WATERS, K. M.;LIU, T.;THRALL, B.;WILEY, H. S. Investigating the correspondence between transcriptomic and proteomic expression profiles using coupled cluster models. **Bioinformatics**, 24, 24, 2894-2900, 2008.
- RYU, O.;HU, J. C.;YAMAKOSHI, Y.;VILLEMAIN, J. L.;CAO, X.;ZHANG, C.;BARTLETT, J. D.;SIMMER, J. P. Porcine kallikrein-4 activation, glycosylation, activity, and expression in prokaryotic and eukaryotic hosts. **Eur J Oral Sci**, 110, 5, 358-365, 2002.

RYU, O. H.;FINCHAM, A. G.;HU, C. C.;ZHANG, C.;QIAN, Q.;BARTLETT, J. D.;SIMMER, J. P. Characterization of recombinant pig enamelysin activity and cleavage of recombinant pig and mouse amelogenins. **J Dent Res**, 78, 3, 743-750, 1999.

SALIDO, E. C.;YEN, P. H.;KOPRIVNIKAR, K.;YU, L. C.;SHAPIRO, L. J. The human enamel protein gene amelogenin is expressed from both the X and the Y chromosomes. **Am J Hum Genet**, 50, 2, 303-316, 1992.

SALVATO, F.;CARVALHO, M. C. C. G.;LEITE, A. L. Strategies for Protein Separation. Leung, H.-C. E. **Integrative Proteomics**. Rijeka, Croatia: InTech, 2012. 3-28.

SANDER, C.;SCHNEIDER, R. Database of homology-derived protein structures and the structural meaning of sequence alignment. **Proteins**, 9, 1, 56-68, 1991.

SCHWANHAUSSER, B.;BUSSE, D.;LI, N.;DITTMAR, G.;SCHUCHHARDT, J.;WOLF, J.;CHEN, W.;SELBACH, M. Global quantification of mammalian gene expression control. **Nature**, 473, 7347, 337-342, 2011.

SEEDORF, H.;KLAFTEN, M.;EKE, F.;FUCHS, H.;SEEDORF, U.;HRABE DE ANGELIS, M. A mutation in the enamelin gene in a mouse model. **J Dent Res**, 86, 8, 764-768, 2007.

SHANKARANARAYANAN, P.;MENDOZA-PARRA, M. A.;VAN GOOL, W.;TRINDADE, L. M.;GRONEMEYER, H. Single-tube linear DNA amplification for genome-wide studies using a few thousand cells. **Nat Protoc**, 7, 2, 328-338, 2012.

SHANNON, P.;MARKIEL, A.;OZIER, O.;BALIGA, N. S.;WANG, J. T.;RAMAGE, D.;AMIN, N.;SCHWIKOWSKI, B.;IDEKER, T. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. **Genome Res**, 13, 11, 2498-2504, 2003.

SHEVCHENKO, A.;TOMAS, H.;HAVLIS, J.;OLSEN, J. V.;MANN, M. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. **Nature Protocols**, 1, 6, 2856-2860, 2006.

SIMMER, J. P.;HU, Y.;LERTLAM, R.;YAMAKOSHI, Y.;HU, J. C. Hypomaturation enamel defects in *Klk4* knockout/LacZ knockin mice. **J Biol Chem**, 284, 28, 19110-19121, 2009.

SIRE, J. Y.;DELGADO, S.;FROMENTIN, D.;GIRONDOT, M. Amelogenin: lessons from evolution. **Arch Oral Biol**, 50, 2, 205-212, 2005.

SMITH, C. E.;NANCI, A.;DENBESTEN, P. K. Effects of chronic fluoride exposure on morphometric parameters defining the stages of amelogenesis and ameloblast modulation in rat incisors. **Anat Rec**, 237, 2, 243-258, 1993.

SMITH, C. E.;RICHARDSON, A. S.;HU, Y.;BARTLETT, J. D.;HU, J. C.;SIMMER, J. P. Effect of kallikrein 4 loss on enamel mineralization: comparison with mice lacking matrix metalloproteinase 20. **J Biol Chem**, 286, 20, 18149-18160, 2011.

- SMITH, G. E. Fluoride, teeth and bone. **Med J Aust**, 143, 7, 283-286, 1985.
- SNEAD, M. L.; ZEICHNER-DAVID, M.; CHANDRA, T.; ROBSON, K. J.; WOO, S. L.; SLAVKIN, H. C. Construction and identification of mouse amelogenin cDNA clones. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 80, 23, 7254-7258, 1983.
- SPAK, C. J.; BERG, U.; EKSTRAND, J. Renal clearance of fluoride in children and adolescents. **Pediatrics**, 75, 3, 575-579, 1985.
- SUN, Z.; CARPIAUX, W.; FAN, D.; FAN, Y.; LAKSHMINARAYANAN, R.; MORADIAN-OLDAK, J. Apatite reduces amelogenin proteolysis by MMP-20 and KLK4 in vitro. **J Dent Res**, 89, 4, 344-348, 2010.
- SUN, Z.; FAN, D.; FAN, Y.; DU, C.; MORADIAN-OLDAK, J. Enamel proteases reduce amelogenin-apatite binding. **J Dent Res**, 87, 12, 1133-1137, 2008.
- TAGUCHI, T.; RAZZAQUE, M. S. The collagen-specific molecular chaperone HSP47: is there a role in fibrosis? **Trends Mol Med**, 13, 2, 45-53, 2007.
- TAKAGI, T.; SUZUKI, M.; BABA, T.; MINEGISHI, K.; SASAKI, S. Complete amino acid sequence of amelogenin in developing bovine enamel. **Biochem Biophys Res Commun**, 121, 2, 592-597, 1984.
- TAVES, D. R. Dietary intake of fluoride ashed (total fluoride) v. unashed (inorganic fluoride) analysis of individual foods. **Br J Nutr**, 49, 3, 295-301, 1983.
- UCHIDA, T.; MURAKAMI, C.; DOHI, N.; WAKIDA, K.; SATODA, T.; TAKAHASHI, O. Synthesis, secretion, degradation, and fate of ameloblastin during the matrix formation stage of the rat incisor as shown by immunocytochemistry and immunochemistry using region-specific antibodies. **J Histochem Cytochem**, 45, 10, 1329-1340, 1997.
- USKOKOVIC, V.; KIM, M. K.; LI, W.; HABELITZ, S. Enzymatic Processing of Amelogenin during Continuous Crystallization of Apatite. **J Mater Res**, 23, 12, 3184-3195, 2008.
- VYMETAL, J.; SLABY, I.; SPAHR, A.; VONDRASEK, J.; LYGSTADAAS, S. P. Bioinformatic analysis and molecular modelling of human ameloblastin suggest a two-domain intrinsically unstructured calcium-binding protein. **Eur J Oral Sci**, 116, 2, 124-134, 2008.
- WAKITA, M. Current studies on tooth enamel development in lower vertebrates. **Kaibogaku Zasshi**, 68, 4, 399-409, 1993.
- WANG, H.; TANNUKIT, S.; ZHU, D.; SNEAD, M. L.; PAINE, M. L. Enamel matrix protein interactions. **J Bone Miner Res**, 20, 6, 1032-1040, 2005.
- WARSHAWSKY, H.; SMITH, C. E. Morphological classification of rat incisor ameloblasts. **Anat Rec**, 179, 4, 423-446, 1974.

WAZEN, R. M.;MOFFATT, P.;ZALZAL, S. F.;YAMADA, Y.;NANCI, A. A mouse model expressing a truncated form of ameloblastin exhibits dental and junctional epithelium defects. **Matrix Biol**, 28, 5, 292-303, 2009.

WESTERMEIER, R.;NAVEN, T. **Proteomics in Practice: A laboratory manual of proteome analysis** - Weinhein: ed. Wiley-VCH, 2002.

WHITFORD, G. M. The metabolism and toxicity of fluoride. **Monogr Oral Sci**, 16 Rev 2, 1-153, 1996.

WIDMER, C.;GEBAUER, J. M.;BRUNSTEIN, E.;ROSENBAUM, S.;ZAUCKE, F.;DROGEMULLER, C.;LEEB, T.;BAUMANN, U. Molecular basis for the action of the collagen-specific chaperone Hsp47/SERPINH1 and its structure-specific client recognition. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 109, 33, 13243-13247, 2012.

WILKINS, M. R.;SANCHEZ, J. C.;GOOLEY, A. A.;APPEL, R. D.;HUMPHERY-SMITH, I.;HOCHSTRASSER, D. F.;WILLIAMS, K. L. Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. **Biotechnol Genet Eng Rev**, 13, 19-50, 1996.

WOLTERS, D. A.;WASHBURN, M. P.;YATES, J. R., 3RD. An automated multidimensional protein identification technology for shotgun proteomics. **Anal Chem**, 73, 23, 5683-5690, 2001.

WRIGHT, J. T.;HART, P. S.;ALDRED, M. J.;SEOW, K.;CRAWFORD, P. J.;HONG, S. P.;GIBSON, C. W.;HART, T. C. Relationship of phenotype and genotype in X-linked amelogenesis imperfecta. **Connect Tissue Res**, 44 Suppl 1, 72-78, 2003.

WRIGHT, J. T.;LI, Y.;SUGGS, C.;KUEHL, M. A.;KULKARNI, A. B.;GIBSON, C. W. The role of amelogenin during enamel-crystallite growth and organization in vivo. **Eur J Oral Sci**, 119 Suppl 1, 65-69, 2011.

YAMADA, Y.;YAMAKOSHI, Y.;GERLACH, R. F.;HU, C. C.;LIU, S.;BARTLETT, J. D.;SIMMER, J. P. Purification and characterization of enamelysin from secretory stage pig enamel. **Arch. Comp. Biol. Tooth Enam**, 8, 21-27, 2003.

YAMAKOSHI, Y.;HU, J. C.;FUKAE, M.;YAMAKOSHI, F.;SIMMER, J. P. How do enamelysin and kallikrein 4 process the 32-kDa enamelin? **Eur J Oral Sci**, 114 Suppl 1, 45-51; discussion 93-45, 379-380, 2006.

YAMAKOSHI, Y.;TANABE, T.;OIDA, S.;HU, C. C.;SIMMER, J. P.;FUKAE, M. Calcium binding of enamel proteins and their derivatives with emphasis on the calcium-binding domain of porcine sheathlin. **Arch Oral Biol**, 46, 11, 1005-1014, 2001.

YATES, J. R., 3RD. Mass spectrometry as an emerging tool for systems biology. **Biotechniques**, 36, 6, 917-919, 2004.

ZHANG, J.;XU, X.;GAO, M.;YANG, P.;ZHANG, X. Comparison of 2-D LC and 3-D LC with post- and pre-tryptic-digestion SEC fractionation for proteome analysis of normal human liver tissue. **Proteomics**, 7, 4, 500-512, 2007.

ZHANG, Y. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. **BMC Bioinformatics**, 9, 40, 2008.

ZHANG, Y. I-TASSER: fully automated protein structure prediction in CASP8. **Proteins**, 77 Suppl 9, 100-113, 2009.

ZHANG, Y.;KIHARA, D.;SKOLNICK, J. Local energy landscape flattening: parallel hyperbolic Monte Carlo sampling of protein folding. **Proteins**, 48, 2, 192-201, 2002.

ZUBAREV, R. A. The challenge of the proteome dynamic range and its implications for in-depth proteomics. **Proteomics**, 13, 5, 723-726, 2013.

Anexos

ANEXO A



**Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru**

Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-901 – C.P. 73
PABX (0XX14)3235-8000 – FAX (0XX14)3223-4679

Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

Fone: (14)3235-8356

e-mail: mferrari@fob.usp.br

CEEPA-Proc. Nº 008/2011

Bauru, 12 de abril de 2011.

Senhora Professora,

O projeto de pesquisa encaminhado a esta Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais, denominado **Análise proteômica da matriz do esmalte de camundongos susceptíveis ou resistentes à fluorose dentária, expostos cronicamente ou não ao flúor na água de beber**, de autoria de Senda Charone e Aline Leite, foi enviado ao relator para avaliação e considerado APROVADO em reunião desta Comissão realizada no dia **11 de abril de 2011**.

Solicitamos que ao final da pesquisa seja enviado, para avaliação desta Comissão, um Relatório com os resultados obtidos para análise ética e emissão de parecer final, o qual poderá ser utilizado para fins de publicação científica.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Gustavo Pompermaier Garlet
Presidente da Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

Profª Drª Marília Afonso Rabelo Buzalaf
Docente do Departamento de Ciências Biológicas