

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**ANÁLISE PROTEÔMICA DO BIOFILME DENTÁRIO EM CRIANÇAS
PORTADORAS DE HIPOMINERALIZAÇÃO MOLAR- INCISIVO
(HMI)**

ANA CRISTINA DE CARVALHO RODRIGUES

BRASÍLIA 2019
ANA CRISTINA DE CARVALHO RODRIGUES

ANÁLISE PROTEÔMICA DO BIOFILME DENTÁRIO EM CRIANÇAS
PORTADORAS DE HIPOMINERALIZAÇÃO MOLAR INCISIVO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Ciência da Saúde da Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Orientador: Professora Doutora Soraya Coelho Leal.

Co-orientador: Professora Doutora Senda Charone.

BRASÍLIA
2019

ANA CRISTINA DE CARVALHO RODRIGUES

**ANÁLISE PROTEÔMICA DO BIOFILME DENTÁRIO EM CRIANÇAS
PORTADORAS DE HIPOMINERALIZAÇÃO MOLAR INCISIVO**

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Odontologia, Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Data da Defesa: 12/06/2019

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Soraya Coelho Leal (Orientadora)

Profa. Dra. Nailê Damê teixeira

Profa. Dra. Marília Afonso Rabelo Buzalaf

Às minhas filhas, Ana Luísa e Bianca pelo despertar do meu autoconhecimento, para que eu lhes ofereça o que há de melhor em mim. Aos meus pais, Adilson e Semírames, pelo exemplo da constância de uma vida virtuosa baseada em princípios morais e éticos. E a Deus o dom da vida, a santa palavra e a graça do amor.

AGRADECIMENTOS

Professora Soraya Coelho Leal, agradeço por seu acolhimento desde o início do ousado projeto de mudar a minha vida. Quanta honra e responsabilidade em tê-la como orientadora. A sua dedicação profissional foi a minha maior inspiração e motivação para superar os difíceis estágios para chegar até aqui. Nunca vou me

esquecer de suas palavras: - “Quem disse que iria ser fácil. Mantenha o foco”. O conhecimento que adquiri através de seus ensinamentos não se restringiram aos aspectos técnico-científicos, mas contribuíram com o meu enriquecimento pessoal. Seu domínio intelectual nos conduz a seguros caminhos e a sua luz incide sobre nós para que possamos também brilhar. Eternamente, muito obrigada.

Professora Senda Charone, obrigada por confiar a mim um projeto espetacular, e ser minha co-orientadora. Você sonhou alto e me levou junto. O seu entusiasmo contagiante me encorajava nas horas de descrença e me enchiam de expectativas à espera do resultado desejado. Obrigada por sua disposição afetuosa em me ensinar, dividir suas experiências, proporcionar mais conhecimento e me capacitar para uma melhor formação profissional. Agradeço enfim, a oportunidade da parceria da minha pesquisa junto ao laboratório de bioquímica da FOB/USP, o quão significativo foi para mim.

Fernanda Raposo e Lúcia Baumotte, minhas companheiras de trabalho. Estivemos juntas nesses últimos três anos dividindo sonhos, aprendizados, desafios, medos e incertezas... E entre risadas, choros, conversas, congressos, aulas, crianças, Cast 4, HMI, FS, Paranoá, HUB, portas fechadas e muitas abertas, fomos construindo nossa pesquisa e nossa amizade. Obrigada pela paciência, disponibilidade, companheirismo, cumplicidade, carinho e a sincera amizade.

Patrícia Medeiros, obrigada por me influenciar e despertar a vontade de entrar no mestrado.

Agradeço à professora Marília Buzalaf pela contribuição científica, pelo apoio técnico e por abrir as portas do laboratório da FOB/USP. Sua parceria foi imprescindível para o sucesso da nossa pesquisa.

Agradeço à Mileni Fernandez e a Larissa Grizzo por me assessorarem durante a execução do estudo piloto e dos estudos laboratoriais no Laboratório de Bioquímica da FOB/USP.

Renata Cabral, obrigada por seu apoio, você sugeriu alguns detalhes que fizeram grande diferença que foram valiosas para finalização da dissertação.

Agradeço a todos os colegas da pós-graduação, em especial a Dani Quaresma, Luciana Mercês, Ingrid Quaresma, Vanessa Reinaldo, tivemos a oportunidade de estarmos mais próximas, conhecermos melhor e a apoiarmos umas às outras tanto no âmbito emocional, intelectual e científico.

Agradeço a todos os docentes do curso de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade de Brasília (UNB) ao amor à docência e à pesquisa e por incitar em nós a busca do desconhecido.

Aos funcionários da UNB, que despercebidamente desempenham suas funções e contribuem para o andamento das atividades da pós-graduação e de toda FS.

Agradeço às crianças, os quais estiveram ao nosso cuidado, contribuindo humildemente com a pesquisa. Aos professores, aos funcionários e aos diretores das escolas que estiveram solícitos e de coração aberto em nos receber, disponibilizando da melhor forma possível os espaços escolares para que pudéssemos trabalhar.

Minha mãe, meu pai, minhas filhas, meus irmãos e toda a família, obrigada por estarem sempre presentes em todos os momentos me dando coragem, conforto, auxílio, incentivo e amor.

Obrigada a Deus por tornar possível todas as coisas.

Com o coração se pede. Com o coração se procura. Com o coração se bate e é com o coração que a porta se abre.”

Santo Agostinho

RESUMO

A Hipomineralização Molar Incisivo (HMI) é uma alteração da estrutura do esmalte de origem sistêmica, que envolve os primeiros molares permanentes (PMPs) e/ou incisivos permanentes (IPs). A susceptibilidade ao desenvolvimento de cárie nos dentes afetados por HMI, devido ao acúmulo de biofilme nas áreas fraturadas deve ser mais bem compreendida, visto que a cárie pode acelerar a progressão desta para estágios mais avançados. Assim, o objetivo deste estudo foi caracterizar o biofilme supragengival de dentes afetados ou não por HMI. Uma análise laboratorial de amostras coletadas de biofilme de PMPs de 60 crianças entre 7-8 anos de idade, de escolas públicas da Região Administrativa do Paranoá-DF foi conduzida. As amostras foram divididas em três grupos – biofilme de dentes sem HMI, com HMI sem fratura pós-eruptiva e com HMI com fratura pós-eruptiva e subdivididas em dois grupos quanto ao tipo de biofilme – fino (B1) e espesso (B2). As amostras foram submetidas à extração, quantificação e digestão de proteínas, que por sua vez foram identificadas por meio da espectrometria de massas. Análises descritivas foram realizadas para caracterizar as amostras e para análise proteômica e identificação das proteínas foi utilizado o software ProteinLynx Global Server. 196 molares foram avaliados, dos quais 60 incluídos no estudo. Ao final foram avaliados biofilme de 25 (69,5%) dentes com HMI e 11 (30,6%) dentes sem HMI. Com relação ao tipo de biofilme, 15 (41,7%) eram do tipo B1 e 21 (58,3%) do tipo B2. Quanto à presença de cárie, 41,68% dos dentes apresentaram cárie. Foram identificadas proteínas do tipo estruturais, de transporte e metabólicas em B1 e B2 e de processos celulares (respostas imunes) apenas em B2. Concluiu-se que a presença dessas proteínas no biofilme espesso pode estar relacionada ao mecanismo de respostas do organismo, frente a mudanças do pH e do equilíbrio bioquímico não identificadas no biofilme fino, uma vez que essas proteínas têm função de reparo e ação antibacteriana.

Palavras-chave: Biofilme; Proteoma; Hipomineralização molar-incisivo.

ABSTRACT

Molar incisor Hypomineralization (MIH) is an enamel structural alteration of systemic origin, which affects the first permanent molars (FPMs) and/or permanent incisors (PIs). The susceptibility to caries development in affected teeth is increased due to the accumulation of biofilm in the fractured areas. This topic

should be better understood, since the presence of carious lesions can accelerate the progression of MIH to more advanced stages. The aim of this study was to characterize the supragingival biofilm of MIH affected and non-affected teeth. A laboratorial analysis of biofilm samples of FPMs collected from 60 schoolchildren aged 7-8 years from Paranoá-DF was conducted. The samples were divided into three groups - biofilm of teeth nonaffected by MIH, MIH-affected teeth without post-eruptive breakdown and MIH-affected teeth with post-eruptive breakdown. Regarding the type of biofilm, they were divided into two groups: - thin (B1) and thick (B2). The samples were submitted to the extraction, quantification and digestion of the protein, which were identified by means of mass spectrometry. Descriptive analysis was carried out to characterize the sample. For proteomic analysis and protein identification, the ProteinLynx Global Server Software was used. 196 molars were evaluated, 60 of which were included in this study. Biofilms of 25 (69.5%) teeth with MIH and 11 teeth without MIH (30.6%) were evaluated. Regarding the type of biofilm, 15 (41.7%) were classified as type B1 and 21 (58.3%) as type B2. Concerning the presence of caries, 55.6% of the included teeth were caries-free. Structural, transport and metabolic proteins were identified in B1 and B2 cases. Cellular process (immune response) was identified only in B2 cases. It was possible to conclude that the presence of these protein in thick biofilm, could be related to the mechanism of responses of the organism to pH changes and biochemical imbalance that were not identified in the thin biofilms. since these proteins have function of repair and antibacterial action.

Keywords: Biofilm; Proteomic; Molar Incisor Hypomineralization.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Classificação e características clínicas quanto ao tipo de biofilme avaliado no estudo: a) dente apresentando opacidade demarcada branca sem biofilme; b) biofilme fino (B1) localizado na região cervical de um dente apresentando opacidade amarela; c) biofilme espesso (B2) em um dente acometido por HMI

com quebra pós-eruptiva com dentina amolecida.

Figura 2 - Fluxograma da distribuição dos grupos estudados na pesquisa

Figura 3 - Preparação das amostras para análise proteômica: - a. extração das proteínas reagente (ureia 7M); b. quantificação das proteínas; c. digestão – tripsina e preparação para a identificação das proteínas; d. identificação do MS - espectrometro.

Figura 4 – Distribuição das crianças avaliadas

Figura 5 - Caracterização das amostras dos molares avaliados.

Figura 6 - Distribuição dos tipos de biofilme analisados de acordo com a característica do dente avaliado.

Figura 7 - Caracterização dos molares nos quais foram coletadas amostras do biofilme.

Figura 8 – Proteínas de Processos Celulares.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Fatores associados à etiologia da HMI segundo diferentes estudos.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Quantificação das amostras do biofilme das crianças estudadas

Tabela 2 – Distribuição das proteínas identificadas no GC de acordo com o processo e função biológica

Tabela 3 – Distribuição das proteínas identificadas no GSF de acordo com o processo e

função biológica

Tabela 4 – Distribuição das proteínas identificadas no GCF de acordo com o processo e função biológica

Tabela 5 – Proteínas identificadas no GC de acordo com o tipo de biofilme

Tabela 6 – Proteínas identificadas no GSF de acordo com o tipo de biofilme

Tabela 7 – Proteínas identificadas no GCF de acordo com o tipo de biofilme

Tabela 8 – Identificação individual da amostra 7 pertencente ao GSF – Biofilme espesso -
- escore cárie 1 – com atividade de cárie

Tabela 9 - Identificação individual da amostra 16 pertencente ao GSF – Biofilme fino
- escore cárie 0 – sem atividade de cárie

Tabela 10 - Identificação individual da amostra 29 (paciente 29) pertencente ao grupo controle
- B1 - escore cárie 0 – sem atividade de cárie

Tabela 11 - Identificação individual da amostra 32 (paciente 32) pertencente ao grupo controle
- B2 - escore cárie 1 – com atividade de cárie

LISTA DE ABREVIATURAS

CPO-D Dentes permanentes cariados perdidos e obturados

MS Espectrometria de massas

EAPD *European Academy of Paediatric Dentistry*

PTS Fosfotransferase

FTF Frutosiltransferase

g Grama

oC Grau Celcius

PTs Fosfotransferase

Gtf Glicosiltransferase

h Hora

HSMD Hipomineralização dos segundos molares decíduos

HMI Hipomineralização molar-incisivo

HUB Hospital Universitário de Brasília

IPs Incisivos permanentes

µg Micrograma

µl Microlitro

mg Miligram

a min Minuto

ml Mililitro

µM Micromolar

M Molar

MIH-SSS *Molar-Incisor hypomineralization severity scoring sistem*

OMS Organização Mundial de Saúde

PEC Matrix Extracelular

PMPs Primeiros molares permanentes

PA Película adquirida

% Porcentagem

kg Quilograma

S Segundos

SM *Streptococcus mutans*

UNB Universidade de Brasília

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	27
1.1 JUSTIFICATIVA	29
1.2 OBJETIVO GERAL.....	29
1.2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	30
2. REVISÃO DE LITERATURA	31

2.1 HIPOMINERALIZAÇÃO MOLAR-INCISIVO.....	31
2.2 PROTEÔMICA DO BIOFILME DENTÁRIO	36
3. METODOLOGIA.....	39
3.1 ASPECTOS ÉTICOS	39
3.2 SELEÇÃO DOS PARTICIPANTES	39
3.3 COLETA DO BIOFILME.....	40
3.4 FORMAÇÃO DOS GRUPOS DE ESTUDO.....	41
3.5 ANÁLISE LABORATORIAL.....	42
3.5.1 EXTRAÇÃO DAS PROTEÍNAS.....	42
3.5.2 QUANTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS POR MEIO DO MÉTODO	
 MICRO BCE (MÉTODO BRADFORD).....	43
3.5.3 DIGESTÃO DAS PROTEÍNAS.....	46
3.5.4 PREPARAÇÃO PARA A ANÁLISE PROTEÔMICA.....	46
3.5.5 ESPECTROMETRIA DE MASSAS.....	47
3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	49
RESULTADOS	50
CARACTERIZAÇÃO DAS CRIANÇAS AVALIADOS.....	50
4.2 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS.....	51
4.3 ANÁLISE PROTEÔMICA.....	53
5. DISCUSSÃO.....	79
CONCLUSÃO.....	84
REFERÊNCIAS.....	85
8. PRESS RELEASE.....	94
APÊNDICE.....	95
APÊNDICE 1 – PARECER CEP UNB/FS.....	95
APÊNDICE 2 – TCLE.....	96

APÊNDICE 3 – TALA.....	98
APÊNDICE 4 - TERMO DE LIBERAÇÃO DA SECRETARIA DE SAÚDE DO DISTRITO FEDERAL.....	99 10.
ANEXO	100
ANEXO 1 – CRITÉRIO ADAPTADO DE RIBEIRO ET AL (2002).....	100
ANEXO 2 – CRITÉRIO NYVAD (2003).....	101
ANEXO 3 - Critério MIH-SSS (2017).....	102
ANEXO 4 – FICHA CLÍNICA.....	103

1. INTRODUÇÃO

A Hipomineralização Molar-Incisivo (HMI) é uma alteração da estrutura do esmalte que afeta os primeiros molares permanentes (PMPs) e/ou incisivos permanentes (IPs) [1]. Todos os aspectos que envolvem esse distúrbio, como etiologia, consequências clínicas e tratamento, são desafiadores. Até a presente data, a literatura disponível não é suficiente para esclarecer totalmente os fatores etiológicos associados à HMI. Devido à falta de padronização das metodologias e a ausência de estudos prospectivos, os dados são ainda inconclusivos [2]. Apesar disso, sugere-se que problemas durante os períodos pré-natal, natal e, principalmente, doenças da primeira infância, as quais em determinadas condições ambientais/sistêmicas, interferem na fase de maturação do esmalte, tendo em vista que a amelogênese é influenciada por desordens sistêmicas, podem estar associadas ao desenvolvimento da HMI [3].

Interferências na fase de maturação do esmalte resultarão em um defeito qualitativo do esmalte, caracterizado por opacidades demarcadas, de aspecto poroso hipomineralizado. As consequências clínicas são as possíveis fraturas pós-eruptivas, sensibilidade dentinária, desenvolvimento de lesão de cárie, restaurações atípicas,

extrações dos PMPs, que ocorre devido à grande perda das estruturas dentárias que inviabiliza o tratamento endodôntico e reconstrução coronária, e por fim, comprometimento estético nos IPs [4].

É de grande relevância o olhar cauteloso para a ocorrência desta patologia. Ao considerar os aspectos clínicos citados acima, e outros fatores como: aspectos socioeconômico, condições gerais de saúde, hábitos de higiene, consumo de açúcar e época de erupção dos PMPs na cavidade bucal, período em que a criança não possui controle motor suficiente para realizar uma boa remoção do biofilme, o controle de lesões de cárie torna-se fundamental para impedir o agravamento da HMI.

A susceptibilidade ao desenvolvimento de lesões de cárie em PMPs afetados por HMI é maior que em PMPs não afetados. Estudos mostram que a HMI é um fator de risco para a instalação do processo cariogênico em crianças de baixo risco para cárie dentária [5,6,7,8]. Considerando, ainda, que a cor das opacidades, branca ou amarela está associada a níveis diferentes de porosidade, sendo maior o grau de desmineralização e menor as propriedades mecânicas nas opacidades amarelas, a

28

incidência de cárie nestas é ainda maior [5,7]. No entanto, é importante ressaltar que o diagnóstico da prevalência de lesão de cárie associada à HMI exige uma avaliação criteriosa, visto que pacientes com alta atividade cárie podem apresentar outros fatores de risco de cárie associados [8].

A Organização Mundial de Saúde (OMS) reconhece que a cárie dentária é uma das doenças não transmissíveis mais prevalentes no mundo [9]. Ela está associada à alta ingestão de alimentos e bebidas ricas em açúcares livres [9,10]. Estudos confirmam que a cárie é uma doença modulada pela dieta [10] e esta nova concepção,

de que a cárie não é mais considerada uma doença transmissível e provocada por um microrganismo específico, implica em um novo entendimento no processo do desenvolvimento da lesão, que requer novas abordagens quanto ao diagnóstico, a prevenção e o tratamento [11].

A cárie é uma doença complexa que depende da relação entre o biofilme e a estrutura mineralizada da superfície do esmalte [11]. É imprescindível compreender que o processo dinâmico de Desmineralização e Remineralização (DES/RE) do esmalte é um mecanismo bioquímico fisiológico de perda e reposição de mineral que ocorre pela alternância de um pH neutro para um pH mais baixo, devido a fermentação de carboidratos pelas bactérias presentes no biofilme dental [11,12]. O desequilíbrio neste processo acarreta uma perda mineral maior sem uma reposição, ocasionando áreas de desmineralização visíveis ao exame clínico [12].

Novas abordagens de pesquisas laboratoriais trazem uma outra percepção para as condições de normalidade e anormalidade do organismo humano. O estudo da proteômica abre uma perspectiva na análise do conjunto de proteínas que modulam as respostas celulares e caracterizam uma situação clínica patológica ou não [13].

A cavidade bucal é um meio rico em proteínas salivares que desempenham papéis importantes e específicos, como os de proteção aos desgastes erosivos, respostas imunológicas, ação antimicrobiana, formação da Película Adquirida (PA), agregação microbiana na PA e proteínas transportadoras de íons [14]. É fundamental, para ampliar o conhecimento sobre os mecanismos moleculares bucais, a identificação das proteínas que estão inseridas na matriz extracelular do biofilme dentário.

A odontologia avança como ciência, lançando mão de ferramentas de alta tecnologia, buscando a aplicabilidade na prática clínica, como um diagnóstico precoce sub-clínico, prevenção de doenças e o mais importante, a melhoria na qualidade de vida do indivíduo. Assim, o objetivo deste estudo foi caracterizar o biofilme supragengival de dentes afetados ou não afetados por HMI.

1.1. JUSTIFICATIVA

A HMI é considerada um problema de difícil manejo clínico que foi descrito na literatura pela primeira vez apenas em 2001 [16]. Já se sabe que áreas afetadas são mais propensas ao desenvolvimento de lesões de cárie, no entanto, nenhum estudo avaliou características do biofilme presente nestas áreas.

O estudo da proteômica é uma ferramenta de alta tecnologia que lança mão da qualificação e da quantificação das proteínas expressas no biofilme que compõem o meio bucal. Tanto a presença como a ausência de determinadas proteínas estão condicionadas a situações clínicas diversas, o que pode resultar em diferentes respostas celulares, visto que as proteínas exercem funções importantes e específicas nos processos moleculares [13,14].

Com o intuito de melhor compreender os mecanismos moleculares bioquímicos do biofilme dos dentes afetados e não afetados por HMI foi realizado a análise do perfil proteico desses.

1.2. OBJETIVO GERAL

Caracterizar o proteoma do biofilme supragengival de dentes afetados e não

afetados por Hipomineralização Molar Incisivo.

1.2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

30

- Identificar o perfil proteico do biofilme de dentes não afetados por HMI, com HMI sem quebra pós-eruptiva e com HMI apresentando quebra pós-eruptiva;
- Comparar o perfil proteico dos biofilmes finos e espessos coletados de dentes com e sem HMI.

31

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 HIPOMINERALIZAÇÃO MOLAR INCISIVO

O esmalte é um tecido dentário mineralizado originário do ectoderma. O processo de formação do esmalte é dividido em alguns estágios, os quais podem sofrer alterações por diversos fatores, que por sua vez podem desencadear diferentes tipos de anomalias de desenvolvimento [1,3,17,18].

A HMI é um tipo de defeito de desenvolvimento do esmalte, definida como uma patologia de origem sistêmica [1,3]. Esta condição ocorre em consequência da deficiência da deposição de mineral sobre a matriz do esmalte na fase de maturação

da amelogênese [3]. Como consequência o esmalte formado apresentará um defeito qualitativo, cuja estrutura é hipomineralizada, porosa, apesar da matriz ter-se desenvolvido normalmente. Esse é um aspecto importante quanto à diferenciação da HMI e da hipoplasia, na qual o defeito é quantitativo, pois o distúrbio acontece na fase de secreção da matriz do esmalte, alterando a morfologia do tecido [3,17,18].

A HMI é tratada como um fenômeno complexo que afeta necessariamente um ou mais PMPs, podendo acometer ou não os IPs. Sugere-se que quanto mais dentes afetados mais grave pode-se considerar a HMI [15].

Os fatores etiológicos associados à HMI permanecem incertos. A maioria dos estudos que aborda o assunto são baseados em questionários e sem padronização metodológica, o que limita a consistência das informações coletados, visto que, são baseadas em memórias de fatos vivenciados em épocas bem anteriores e muitas variáveis associadas.

Adicionalmente, o diagnóstico é realizado tardiamente com a erupção dos PMPs e IPs, havendo um intervalo considerável entre o período das injúrias sofridas e a detecção dos seus efeitos. Os principais fatores descritos na literatura associados ao desenvolvimento da HMI estão apresentados no quadro 1 [2,3,17,19,20].

Crombie et al (2009)

Revisão
sistemática

Fatores natais, neonatais, nutricionais, doenças crônicas e agudas da infância e exposição à bifenóis e dióxidos. Silva et al

(2016)

Revisão de
literatura

Fatores pré-natais: doenças maternas, medicação no período gestacional; fatores natais: complicações no parto e prematuridade, doenças da infância: febre, asma, pneumonia. Giuca et al,

2018

Transversal Distúrbios de garganta, ouvido e nariz nos primeiros anos de vida e uso de antibióticos no período gestacional.

Koruyucu et al,

2018

Transversal Complicações na gestação e no parto e doenças da infância nos primeiros anos de vida.,

Quadro 1 –Fatores associados à etiologia da HMI segundo diferentes autores.

Quanto à prevalência da HMI, apesar da variação nos valores reportados, esta pode ser considerada alta. Os primeiros relatos sobre HMI se deram por meio de casos discutidos no Congresso da EAPD (*European Academy of Paediatric Dentistry*) no ano 2000, evento no qual diferentes pesquisadores perceberam a semelhança entre os casos clínicos apresentados [4,15,16]. A partir disso, o fenômeno foi reconhecido como uma patologia e pesquisas foram iniciadas em busca de evidências para elucidar os fatores etiológicos, a prevalência e definir a melhor forma de diagnóstico.

33

Um estudo mais recente de maior abrangência analisou a prevalência da HMI e estimou uma alta prevalência global 14,2% [21]. Shwendicke et al (2017) [22] também evidenciaram uma alta prevalência da HMI 13,1% e uma alta incidência com 17,5 milhões de novos casos em 2016. Apesar disso, os estudos de prevalência podem ser considerados limitados devido à divergência na forma de classificar o problema. Fatores como perda dentária, restaurações atípicas e cárie associada às quebras pós-eruptivas são, por vezes, sub-diagnosticados ou não incluídos como

agravamento da HMI. Outro ponto a ser ressaltado refere-se a uma variação que pode ocorrer dependendo de onde o estudo foi realizado, uma vez que o nível socioeconômico e cultural, bem como o acesso à saúde podem influenciar nos resultados [21,22].

Clinicamente, as áreas afetadas do esmalte pela HMI apresentam espessura normal, com alteração na translucidez, o que confere áreas com opacidades demarcadas hipomineralizadas de aspecto poroso, que são circundadas por um esmalte de aspecto normal, com uma borda bem definida separando o esmalte afetado do normal [1,3,18]. A coloração varia conforme a gravidade das opacidades, que se manifestam do branco-creme para o amarelo-marrom, sendo que quanto mais escuro, mais poroso e frágil é o esmalte. E em relação ao tamanho das áreas afetadas, estas devem ser registradas quando ≥ 1 mm [6].

A análise morfológica de 73 PMPs extraídos em decorrência de lesões de esmalte hipomineralizado indicou que as áreas hipomineralizadas apresentaram graus variados de porosidade, sendo as lesões de coloração amarelo-marrom mais porosas que as branco-creme, estendendo se por toda a camada do esmalte, enquanto as branco-creme estavam restritas às camadas mais internas [18].

No que se refere à classificação da HMI, esta pode ser feita considerando a gravidade do problema, em grau leve (opacidades demarcadas sem fratura e leve sensibilidade) e grau severo (opacidades demarcadas com quebras pós-eruptivas, grande sensibilidade dentinária, presença de lesões de cárie e restaurações atípicas) [15]. Porém, essa caracterização não é consenso, uma vez que, foi sugerido classificar o problema em leve, moderado e severo [8].

Quanto ao diagnóstico da condição, é essencial estabelecer um critério que

abranja um amplo espectro da HMI. Um novo sistema para diagnóstico da HMI

34

denominado MIH-SSS (*Molar incisor hypomineralization severity scoring system*), o qual abrangeu todos os estágios do defeito foi testado e validado [23]. Os códigos foram propostos de acordo com o agravamento da condição. Um aspecto importante foi a inclusão de códigos distintos para dentes com quebras pós-eruptivas, acometidos ou não por cárie, fato que fez este sistema ter sido escolhido como critério de diagnóstico da HMI neste estudo.

A discussão mais relevante relacionada à HMI refere-se ao risco das quebras pós-eruptivas, e, por conseguinte, o controle da progressão para os estágios mais graves, pois há uma rápida evolução para a perda dos dentes afetados. Estudos observaram que crianças portadoras de HMI tendem a sofrer mais tratamentos restauradores que crianças sem HMI [6,8]. A quebra das áreas porosas do esmalte ocorre em função da diminuição das propriedades mecânicas destas regiões, devido ao maior conteúdo de carbonato, como consequência, diminuindo a resistência do esmalte aos esforços mastigatórios [18]. Além disso, as porosidades tornam o esmalte mais permeável, o que facilita a penetração de bactérias na subsuperfície do esmalte provocando uma inflamação crônica e hipersensibilidade dentinária [15]. Tanto as quebras pós-eruptivas quanto a sensibilidade dentinária facilitam o acúmulo de biofilme sobre a superfície do dente e contribuem para o desenvolvimento de lesões cariosas. Quanto à cárie dentária, estudos relatam uma associação entre cárie e HMI [5,6,7,8, 24]. Já foi demonstrado que o tipo de opacidade e a gravidade da HMI estão associados ao risco de desenvolvimento à cárie em crianças afetadas [4,5,6,8]. Porém, é necessário considerar os fatores de risco e fatores determinantes para o

desenvolvimento de cárie em dentes afetados ou não pela HMI [7,8,20].

O quadro clínico mais frequentemente observado são os defeitos leves sem quebras pós-eruptivas [6], porém quando ocorrem são a principal causa do aumento da gravidade da HMI em PMPs [5]. Observa-se um índice de CPOD maior em dentes com HMI [6,5] o que pode também contribuir para o agravamento do defeito. A progressão da HMI ao longo tempo está relacionada ao tipo de opacidade, à susceptibilidade das quebras pós-eruptivas, à presença da cárie, e às características individuais de cada dente, como localização no arco dentário e localização da

35

opacidade no dente – regiões oclusais apresentam maior risco à fratura, devido às forças mastigatórias [5].

Grossi et al (2017) [7] compararam a presença de cárie em crianças afetadas pela HMI com crianças não afetadas. Um estudo de caso/controle foi realizado em 260 crianças com idades de 7 a 13 anos de uma região do Distrito Federal (DF), as quais foram alocadas em dois grupos afetados e não afetados pareadas por sexo, idade e escola. Os resultados mostraram que não houve diferença na prevalência de cárie de esmalte entre os dois grupos, mas para cárie em dentina, que foi significativamente maior em crianças com HMI em comparação às não afetadas. Observou-se também, que o aumento da gravidade resultou em um número maior de presença de cárie em dentina. O estudo concluiu que a cárie está mais presente em dentes afetados do os que não afetados e a HMI é fator de risco para o desenvolvimento da cárie.

Costa Silva et al (2017) [24] analisaram a influência da HMI, bem como os fatores de risco que determinam a incidência de cárie nos PMPs em uma coorte de dois anos (2010 a 2012) em 142 crianças em idades de 5 e 6 anos. Os resultados

mostraram uma diferença significativa nas taxas de sobrevivência de dentes com e sem HMI. Crianças com placa visível nos dentes anteriores apresentaram maior risco de desenvolver cárie nos PMPs durante os dois anos de acompanhamento. A HMI e a presença de placa foram considerados fatores de risco para o desenvolvimento de cárie.

Ebel et al (2018) [25] ao investigar a relação entre a gravidade da HMI, o acúmulo de biofilme, a hipersensibilidade, a associação do risco de cárie e a qualidade de vida relacionada à saúde bucal de 250 crianças com idade média de 9 anos afetadas por HMI observaram que o acúmulo de biofilme está significativamente associado à gravidade do problema. Observaram também que a higiene bucal é comprometida em função do grau de hipersensibilidade nos dentes afetados.

Raposo et al (2019) [26] ao avaliar a prevalência e a intensidade da hipersensibilidade dentária em dentes com HMI encontraram uma diferença estatisticamente significativa entre molares afetados e não afetados pela HMI. A hipersensibilidade esteve associada à presença de opacidades demarcadas e à presença de quebras pós-eruptivas restritas ao esmalte.

36

2.2 PROTEÔMICA DO BIOFILME DENTÁRIO

Conforme descrito anteriormente, acredita-se que existe uma predisposição ao acúmulo de biofilme em dentes afetados por HMI em especial nos casos graves. Sobre isso, é importante ressaltar alguns aspectos relacionados à formação dos biofilmes bacterianos. As células bacterianas que compõem o biofilme interagem entre si e coordenam a expressão de um amplo número de genes em resposta às condições

ambientais, incluindo PH, oxigênio, fontes de carbono e a disponibilidade de nutrientes, densidade celular e a presença de uma superfície sólida. Uma série de funções fisiológicas e bioquímicas altamente coordenadas são necessárias para que as bactérias formem biofilmes maduros [27-30]. O biofilme dentário acumulado a longo prazo pode estar mais condensado e expressar diferenças no processo metabólico bacteriano [31,32]. A adaptação de microrganismos no biofilme envolve regulação de genes, de modo a otimizar as propriedades fenotípicas de um ambiente em particular.

Sabe-se da importância dos SM em relação à cárie dentária humana, uma vez que são frequentemente isolados nas cavidades de lesões cariosas, induzem o desenvolvimento da cárie em animais alimentados com uma dieta rica em sacarose, são altamente acidogênicos e acidúricos e são capazes de produzir glucanos insolúveis em água, os quais promovem aderência bacteriana na superfície dentária e em outras bactérias [33]. Sua habilidade para formar biofilmes, captar e catabolizar uma variedade de carboidratos, e tolerar flutuações na disponibilidade de nutrientes e PH são considerados cruciais para sua sobrevivência, persistência e capacidade de desenvolver lesões de cárie.

A manutenção de níveis baixos de pH na matriz do biofilme cariogênico diminui a concentração de íons cálcio, fósforo e flúor no biofilme [34]. Uma das hipóteses, que explica a baixa concentração desses íons, é a composição proteica do biofilme, uma vez que estudos mostram diferenças evidentes do perfil proteico extraído de três condições distintas de biofilme – presença da sacarose, ausência da sacarose e a presença da frutose e da glicose [35].

O total de íons cálcio presente no biofilme pode estar 33% livres no fluido da matriz extracelular, 17% ligados a fosfatos e 50% a outras espécies como as

proteínas, fato esse que demonstra a relevância da presença de proteínas ligadoras de cálcio no biofilme para a manutenção da concentração desses íons no mesmo [36]. E, portanto, a ausência dessas proteínas mediadas por alterações bioquímicas do biofilme, influenciam a concentração de íons cálcio na matriz do biofilme [35,37,38].

As proteínas ligadoras de cálcio são identificadas na saliva, película adquirida e nos fluidos creviculares [39-41]. Por apresentarem baixo peso molecular são propensas a manter o equilíbrio nos fluídos do biofilme e podem participar dos processos de Des/Re, como também no metabolismo do biofilme na interface dente/saliva [42perynpanayagan 1995]. Porém, todas as funções dessas proteínas não foram ainda relatadas [34].

Além disso, bactérias orais também expressão proteínas sob diferentes condições no biofilme. As alterações metabólicas provocadas pela colonização de novas bactérias ao biofilme representam a transição de um biofilme não cariogênico para um biofilme patológico [34]. A identificação do perfil proteico dos microorganismos orais auxiliam na compreensão da patogenicidade do biofilme, visto que a regulação positiva de determinadas proteínas, como as enzimas glicolíticas ou as proteínas *EF TU* e a *TUF* determinam a patonenicidade desse biofilme representado pela regulação gênica desses microorganismos [34,4308].

Portanto, seria interessante, caracterizar o perfil proteico do biofilme supragengival de crianças com e sem a presença de HMI associando com a atividade de cárie, com um estudo *in vivo*, uma vez que, os estudos para elucidar a influência das condições do meio na composição da matriz extracelular foram em sua maioria conduzidos *in vitro*.

3. METODOLOGIA

3.1. ASPECTOS ÉTICOS

Esta pesquisa foi submetida ao Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília e aprovada com o parecer número 2.041.846 02/05/2017 (Apêndice 1).

A autorização prévia dos responsáveis legais para o exame clínico e participação da pesquisa foi firmada pelo Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice 2) associado ao Termo de Assentimento concedido pela criança (Apêndice 3).

O termo de liberação ao acesso das escolas foi concedido pela Secretaria de Educação do Distrito Federal (Apêndice 4).

As crianças examinadas que apresentavam necessidade de atendimento clínico odontológico foram submetidas ao tratamento na própria unidade escolar, sendo encaminhadas ao Hospital Universitário de Brasília os casos graves de lesão de cárie em dentina que precisavam de tratamento endodôntico.

3.2. SELEÇÃO DOS PARTICIPANTES

A amostra que compôs esta pesquisa derivou-se de um estudo mais amplo, de cunho epidemiológico, desenvolvido em seis escolas públicas no Paranoá-DF, onde 410 crianças foram avaliadas em relação a presença de HMI. Para a presente pesquisa foram selecionados 60 dentes de crianças de 7 a 8 anos de idade, que gozavam de boa saúde sem comprometimento sistêmico, motor ou psicológico e que

apresentavam os quatro primeiros molares permanentes irrompidos com ao menos um deles acometidos por Hipomineralização Molar-Incisivo. É necessário ressaltar que a amostra foi selecionada por conveniência, conforme as condições estabelecidas para o estudo eram observadas ao exame clínico, as coletas foram realizadas até se obter o número estabelecido de amostras para o estudo.

Todas as crianças foram avaliadas por uma única examinadora treinada e calibrada para a caracterização do biofilme, diagnóstico de cárie e diagnóstico da HMI utilizando o critério adaptado de Ribeiro et al – 2002 (Anexo 1) [44] e Nyvad et al – 2003 (Anexo 2) [45] para biofilme e cárie respectivamente. Para HMI foi utilizado o

39

MIH-SSS (Anexo 3) [23]. Para cárie e HMI, o valor de kappa para o biofilme foi $\geq 0,90$, para HMI $>$ e para cárie $>$. Os exames clínicos foram realizados na própria escola, com a criança deitada numa maca utilizando-se sonda OMS, espelho clínico, gaze e jato de ar. Uma assistente, também treinada e calibrada, fez o registro das informações em uma ficha clínica elaborada para este estudo (Anexo 4).

A avaliação do biofilme supragengival considerou a quantidade do mesmo. Se, somente após uma secagem suave com uma gaze na superfície do dente, o biofilme foi visualizado, este foi considerado fino (B1) e espesso (B2) quando visualizado sem a secagem (Figura 1).

Figura 1 – Classificação e características clínicas quanto ao tipo de biofilme avaliado no estudo: a) dente apresentando opacidade demarcada brancas em biofilme; b) biofilme fino (B1) localizado na região cervical de um apresentando opacidade amarela; c) biofilme espesso (B2) em um dente acometido por HMI com quebra pós-eruptiva com dentina amolecida.

3.3. COLETA DO BIOFILME

As amostras foram coletadas após o exame clínico e classificação do biofilme supragengival, por uma pesquisadora treinada para isso. O biofilme supragengival foi removido da superfície dentária da face vestibular na região cervical, independentemente da face da fratura pós-eruptiva, com o auxílio de curetas dentinárias nº 19 (Duflex®) estéreis. Em seguida armazenado em tubos

40

ependorffs estéreis e secos e acondicionados em recipiente resfriado até o deslocamento da escola para o Laboratório de Patologia Odontológica da UNB,

onde ficaram armazenados sob uma temperatura de – 80oC até serem transportados para o Laboratório de Bioquímica da FOB/USP para as análises laboratoriais.

3.4. FORMAÇÃO DOS GRUPOS DE ESTUDO

Biofilmes coletados de 60 dentes foram alocados nos seguintes grupos: Grupo Controle (GC) (n=20); Grupo HMI sem Fratura pós-eruptiva (GSF) (n=20); Grupo HMI com fratura pós-eruptiva (GCF) (n=20), que por sua vez foram subdivididos em dois subgrupos: biofilme fino (n=10) e biofilme espesso (n=10). As amostras do biofilme do grupo controle foram obtidas de molares não acometidos por HMI, porém da boca de uma criança que apresentasse ao menos um molar afetado. Para o grupo HMI sem fratura pós-eruptiva foram incluídos biofilme de dentes apresentando opacidades brancas (MIH-SSS código 1) ou amarelas (MIH-SSS código 2).

Finalmente, para o grupo HMI com fraturas pós-eruptivas onde foram coletados biofilme de dentes apresentando fratura restrita ao esmalte em opacidades brancas (MIH-SSS código 3), fratura restrita ao esmalte em opacidades amarelas (MIH-SSS código 4), fraturas em dentina endurecida (MIH-SSS código 5) e fraturas em dentina amolecida (MIH-SSS código 6) (Figura 2).

Figura 2 – Fluxograma da distribuição dos dentes e do tipo de biofilme estudado.

3.5 ANÁLISE LABORATORIAL – PREPARO DAS AMOSTRAS

3.5.1 EXTRAÇÃO DAS PROTEÍNAS

Para a extração das proteínas do biofilme foi estabelecido o protocolo de extração de proteínas utilizado pelo próprio LB-FOB/U SP. Para isso, foram adicionados nas amostras uma solução tampão de lise de ureia 7 M e tiouréia 2 M. Para a obtenção da solução tampão foram pesados 10,5 g de ureia e 3,8 g de tiouréia

acrescentados de água pura (deionizada). Para as amostras que continham biofilme do tipo fino foram diluídos 50 µl de solução tampão de lise e para as amostras contendo biofilme espesso foram diluídos 100 µl do tampão. Em seguida as amostras foram armazenadas no gelo e agitadas por 5 s de 10/10min durante 1h no vortex para auxiliar na homogeneização da solução. Após este período as amostras foram levadas à sonificação (Ultra Cleaner – Unique – 1600 A) por 5 min e depois por mais 5 min –

42

este processo é necessário para a desativação de materiais orgânicos. Em seguida as amostras foram centrifugadas a 1400 x g por 10 min a uma temperatura de 4°C. Após este processo foram coletados o sobrenadante e transferidos para novos tubos eppendorffs, e o pellets armazenados a – 80 C (Figura 3a).

Após a extração uma alíquota de cada amostra foi separada para a quantificação proteica no método Micro BCA e o restante foi preparado para a digestão em tripsina e analisado no nanoLC-ESI-MSMS.

3.5.2 QUANTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS POR MEIO DO MÉTODO MICRO BCA (MÉTODO BRADFORD)

A tabela 1, demonstra os valores quantitativos das proteínas extraídas para a identificação no espectrômetro de massas (Figura 3b).

43

Tabela 1- Quantificação das amostras de biofilme das crianças avaliadas no estudo.

rais
/

Amostra

Volume

**microlitro/50
microgramas de
proteínas
Volume
microlitro/50
microgramas de
proteínas**

³ 346,16 144,44

⁴ 448,58 11,46

⁶ 862,70 57,96

⁷ 576,23 86,77

⁸ 525,76 95,10

⁹ 647,47 77,22

¹⁰ 313,50 159,49

¹¹ 188,82 264,80

¹⁶ 699,96 71,49

¹⁷ 553,96 90,26

^{22.} 1109,10 45,08

²³ 236,32 211,58

²⁶ 374,36 133,56

²⁷ 389,20 128,47

²⁹ 797,39 62,70

³² 743,96 67,21

33 372,87 134,09

35 512,40 97,58

36 1560,33 32,04

37 246,29 203,01

44

38 578,44 86,44

41 921,30 54,27

42 1181,13 42,33

43 921,30 54,27

44 1228,00 40,72

45 228,88 218,46

46 179,32 278,83

48 196,73 254,15

49 539,60 92,66

50 117,71 424,76

51 239,90 214,69

52 231,56 215,93

54 376,20 132,91

56 598,53 83,54

59 303,88 164,54

60 376,20 132,91

45

3.5.3 DIGESTÃO DAS PROTEÍNAS

As amostras foram separadas em alíquotas de 50 μ L e acrescentado 50 μ M de bicabornato de amônio (Ambic) para aumentar o volume final para 60 μ L. Em seguida foi acrescentado nas amostras 25 μ L de RapiGest SF 0,2%, agitado em vórtex e aquecido por 60 minutos na temperatura de 37°C (Figura 3c).

Posteriormente foram adicionados na amostra 2,5 μ L ditioneitol (DTT) 100 μ M diluídos em 100 μ L de Ambic 50 μ M e aquecido por 40 min à uma temperatura de 37°C. Foi realizado o resfriamento em temperatura ambiente por 2 min e centrifugado. Então, foram adicionados 2,5 μ L de iodoacetamida (IAA) 300 μ M, agitado em vórtex, e as amostras incubadas por 30 min em temperatura ambiente. Por fim, foram acrescentados 10 μ L de solução de Tripsina e agitado com movimentos de up and down com a própria pipeta, deixado em “overnight” para a digestão em uma temperatura de 37°C.

Após a digestão, foram então adicionados 10 μ L de ácido fluoacético (TAF) 5 % e agitado em vórtex. As amostras foram novamente incubadas em 37o C por 90 min, centrifugadas a 14000 rpm a 6o C por 30 min e transferidas com o sobrenadante para um novo tubo sem tocar no pellet. A partir desse ponto as amostras passaram pelas colunas C18 para a purificação dos peptídeos antes de serem analisados no nanoLC-ESI-MSMS (Figura 3c).

3.5.4. PREPARAÇÃO PARA A ANÁLISE PROTEÔMICA

Para a análise proteômica das amostras foi realizada previamente a preparação das colunas C18, para a purificação da amostra. Antes de iniciar o preparo das colunas, foram misturados 3 partes de cada amostra com a solução S1. Após este processo, as colunas foram posicionadas em um tubo de 2,0 mL e lavadas as paredes com a mistura da amostra e solução S1. Em seguida adicionou-se 200 µL de solução S2 à coluna, lavando-se as paredes da coluna para umedecer as mesmas. As amostras foram centrifugadas a 1500 xg por 1 min. Repetiu-se então o processo com S2, S3 e S4 até a remoção da coluna e submissão da amostra para secagem em concentrador até aproximadamente 1 µL (Figura 3c,d).

46

Após a limpeza as amostras foram ressuspendidas em 108 µL em uma solução de ácido fórmico (AF) 0,1% em acetonitrila (ACN) 3% (AF/ACN). Na sequência foram adicionados 12 µL de 1 pmol/ µL de padrão (ADH, Enolase ou Albumina) à amostra purificada e agitada em vórtex, para então, as amostras serem transferidas para os frascos de análise (Total Recovery Vial, Waters Part #186000385c).

3.5.5. ESPECTROMETRIA DE MASSAS

A identificação dos peptídeos foi realizada no sistema nanoACQUITY UPLC[®]Xevo QToF MS System (WATERS). O nanoACQUITY UPLC[®] está equipado com uma coluna analítica de fase reversa nanoACQUITY HSS T3 (75 µm X 150 mm,

tamanho de partícula de 1,8 μm , Waters). A coluna foi equilibrada com 93% da fase móvel A (ácido fórmico 0,1% em água) e 7% da fase móvel B (100% ACN + 0,1% ácido fórmico). Em seguida, os peptídeos foram separados com um gradiente linear da fase móvel de 7-85 % (ácido fórmico 0,1 % em ACN 100%) por 70 min num fluxo de 0,35 $\mu\text{L}/\text{min}$ a 35°C.

O espectrômetro de massas Xevo® G2 Q-TOF foi operado em modo iônico positivo de nanoeletrospray e os dados coletados usando o método MSE em elevada energia (19-45 V). As condições de fonte usadas foram: voltagem do capilar 2,5 kV, cone de amostra 30 V, cone de extração 5,0 V e temperatura da fonte 80°C. Os dados foram adquiridos em triplicatas, durante 70 min, com varredura na faixa de 50–2000 Da. O lockspray, usado para garantir acurácia e reprodutibilidade, foi operado com uma solução de [Glu1] fibrinopeptídeo (1 pmol/ μL), com fluxo de 1 $\mu\text{L}/\text{min}$. A identificação das proteínas foi obtida utilizando-se o software ProteinLynx Global Server (PLGS) versão 3,0, por meio do algoritmo de contagem de íons incorporado ao software. A diferença de expressão entre os grupos foi obtida empregando-se o mesmo software, considerando-se $p < 0,05$ para as proteínas subreguladas e $1 - p > 0,95$ para as proteínas supreguladas (Figura 3d).

a)

d)

b)

c)

48

Figura 3: Preparação das amostras para análise proteômica: a) extração de proteínas – reagente (ureia 7M); b) quantificação de proteínas; c) digestão - Tripsina e preparação das amostras para identificação de proteínas – colunas c18; d) identificação no MS - Espectrometro.

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a caracterização da amostra, foram realizadas análises descritivas.

Todos os molares analisados foram caracterizados quanto à presença de

biofilme, HMI e cárie dentária. Para a classificação das crianças em relação à atividade de cárie foi considerado a presença de qualquer dente, independentemente do molar de estudo de acordo com o critério Nyvad – códigos 1,2,3 .

Para a análise proteômica e identificação das proteínas humanas foi utilizado software ProteinLynx Global Server (PLGS) versão 3,0 e o banco de dados UNIPROT.

49

4. RESULTADOS

4.1. CARACTERIZAÇÃO DAS CRIANÇAS AVALIADOS DURANTE O ESTUDO

Foram avaliadas 410 crianças, das quais 49 apresentavam HMI, resultando em uma prevalência de 11,95%. Quanto ao número de dentes, foram examinados 196 primeiros molares permanentes dos pacientes portadores, dos quais 120 estavam afetados. Nem todas as crianças que foram incluídas apresentavam os quatro primeiros molares permanentes irrompidos. A figura 4 representa esquematicamente os achados do levantamento epidemiológico.

	afetadas
	não afetadas n
	= 361
Crianças	
n = 49	
n = 410	

Figura 4 – Distribuição de todas as crianças avaliadas

Para os 196 molares avaliados no presente trabalho, observa-se as características em relação ao biofilme, presença ou não de HMI e atividade de cárie foram avaliadas. Os resultados estão apresentados na figura 5.

50

Figura 5. Características dos molares avaliados.

Foram detectados 16 molares sem a presença de biofilme. Destes, 9 pertencentes ao grupo controle e 7 ao grupo HMI. Como esperado, na maioria desses dentes não foi detectada lesões de cárie dentária (n=13). Observou-se uma frequência de biofilme fino maior que o de biofilme espesso nos molares sem HMI e com HMI

sem fratura pós-eruptiva, e para os molares com HMI com fratura pós-eruptiva observou-se uma frequência maior de biofilme espesso.

Foram observados um percentual maior da presença de cárie nos dentes com HMI, 59,09% para dentes com HMI sem fratura pós-eruptiva e 65,62% para dentes com HMI com fratura pós-eruptiva. E em relação a atividade de cárie na criança, apenas 5 crianças não apresentaram qualquer cárie na boca independentemente da condição do dente.

4.2 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

51

Foram avaliados biofilme de 60 dentes distribuídos igualmente em três grupos, 20 GC, 20 GSF, 20 GCF. No entanto, 24 amostras do biofilme apresentaram baixa quantificação proteica, o que resultou em 36 amostras de biofilme para análise proteômica conforme apresentado na Figura 6.

Figura 6 - Distribuição dos tipos de biofilme analisados de acordo com a característica do dente avaliado

A figura 7 apresenta a descrição das características dos molares nos quais foram coletadas amostras de biofilme.

Figura 7. Caracterização dos molares nos quais foram coletadas amostras de biofilme.

n=11

30

GC

,6%

Amostras de biofilm

n

n=14

38

=36

GSF

,9%

e

n=11

30

GCF

,6%

4.3. ANÁLISE PROTEÔMICA

Foram identificadas diversas proteínas, as quais, estão envolvidas em processos celulares, de estrutura do citoesqueleto, metabolismo energético e transporte, conforme descrito nas tabelas 2 a 4. Na figura 8, observa-se as proteínas de função de processos celulares, essas foram identificadas no biofilme espesso das amostras de dentes com HMI e sem HMI e que não foram identificadas no biofilme fino.



Figura 8 – Proteínas de Processos Celulares

As proteínas, *Actin, cytoplasmic 1, Actin, cytoplasmic 1, A,ctin, gamma-enteric smooth muscle, Actin, gamma-enteric smooth muscle C, POTE ankyrin domain family member F, POTE ankyrin domain family member E, POTE ankyrin domain family*

member J, POTE ankyrin domain family member I, Actin, alpha skeletal muscle, Actin, aortic smooth muscle, Actin, alpha cardiac muscle 1, foram identificadas em todos os

53

grupos, GC, GSF, GCF. Estas são proteínas de função de metabolismo, de processos celulares, de estrutura e de transporte.

Foram observadas também proteínas ligadoras de cálcio, ligadoras de outras proteínas, e ligadoras de enzima - *Keratin, type II cytoskeletal 79, Serum albumin, Albumin_Isoform CRA*, essas proteínas foram identificadas nos GC e GCF.

As proteínas de função metabólica - *Actin, cytoplasmic 2, Actin, alpha skeletal muscle, Keratin, type I cytoskeletal 15 e suas isoformas, Putative beta-actin-like protein 3, Beta-actin-like protein 2* - identificadas nos três grupos, podem estar associadas ao metabolismo energético das bactérias presentes no biofilme.

As identificações das proteínas presentes de acordo com a características do dente e o tipo de biofilme estão apresentados nas tabelas 5 a 7.

Exemplo de identificações de proteínas individuais para cada tipo de amostra com as características do dente, tipo de biofilme, cárie e atividade de cárie estão apresentados nas tabelas de 8 a 11.

54

Tabela 2: Distribuição das proteínas identificadas no GC de acordo com o processo e função biológica

Proteína *espécie <i>homo sapiens</i>	Score	ID Uniprot	Processo
Biológico			Função Biológica
Actin, cytoplasmic 1	87,29	C9JTX5	Estrutural
Actin, cytoplasmic 2	130,83	P63261	Estrutural
			e transporte
Citoesqueleto e			

Transporte de ATP

Actin, gamma-enteric smooth muscle 87,29 B8ZZJ2 Metabolismo Enzimático
Actin, gamma-enteric smooth muscle C 87,29 F8WB63 Metabolismo Enzimática
POTE ankyrin domain family member F 87,29 A5A3E0 Metabolismo Enzimático
POTE ankyrin domain family member E 87,29 Q6S8J3 Metabolismo Enzimático
POTE ankyrin domain family member J 87,29 P0CG39 Metabolismo Enzimático
POTE ankyrin domain family member I 87,29 P0CG38 Metabolismo Enzimático
Actin, alpha skeletal muscle 87,29 P68133

Transporte e processos celulares

Transporte de ATP e

Respostas a hormônios esteroidais

Actin, aortic smooth muscle 87,29 F6QUT6 Metabolismo Enzimático

Keratin, type I cytoskeletal 13 124,48 P13646 Estrutural Organização do

citoesqueleto

55

Keratin, type I cytoskeletal 10 32,58 P13645

Estrutural

Transporte

Componente celular e Transporte de proteínas

Keratin, type I cytoskeletal 15 27,45 P19012

Estrutural

Transporte

Organização do citoesqueleto e Transporte de proteína

Keratin, type II cytoskeletal 6A 779,29 P02538 Estrutural Componente celular

Keratin, type I cytoskeletal 12 44,95 Q99456 Estrutural Componente celular

Keratin, type II cytoskeletal 73 108,94 Q86Y46 Estrutural Componente celular

Keratin, type II cytoskeletal 6B 771,49 P04259 Estrutural Desenvolvimento

ectoderma

Keratin, type II cytoskeletal 78 24,89 Q8N1N4 Estrutural Componente celular

Keratin, type II cytoskeletal 4 102,57

P19013

Estrutural Componente celular

Keratin, type II cytoskeletal 5 585,66 H0YIN9 Estrutural Organização

citoesqueleto

Keratin, type II cytoskeletal 2 541,81 P35908

Organização Estrutural

citoesqueleto

Transporte

Transporte de

proteínas Keratin, type II cytoskeletal 74 24,89 F8W1S1 Estrutural Organização

citoesqueleto

56

Keratin, type II cytoskeletal 75 523,29 O95678 Estrutural Componente celular

Keratin, type II cytoskeletal 13 72,24 K7EMD9

Organização
citoesqueleto

Transporte de
proteínas

Keratin, type II cytoskeletal 6C 771,49 P48668 Estrutural Componente celular

Keratin, type II cytoskeletal 79 498,40 Q5XKE5

Estrutural

Transporte

Estrutural

Transporte

Componente celular e Transporte de enzimas Keratin, type II cytoskeletal 2 oral 43,4 Q01546 Estrutural
Componente do

citoesqueleto

Serum albumin 121,24 P02768 Transporte Transporte de metais

Albumin_isoform CRA 121,4 C9JKR2 Organização Organização celular

Neurofilament heavy polypeptide 24,89 P12036

Estrutural

Transporte

Componente celular e Transporte de proteínas

Tabela 3: Distribuição das proteínas identificadas no GSF de acordo com o processo e
função biológica

Proteína *espécie *homo sapiens* Score ID Uniprot Processo

Biológico Função Biológica

Actin, cytoplasmic 1 102,01 C9JTX5 Estrutural Composição celular

57

Actin, cytoplasmic 2

258,53 J3KT65

Estrutural

Transporte

Citoesqueleto e

Transporte de ATP

Actin, gamma-enteric smooth muscle 102,01 C9JFL5 Metabolismo Enzimática

Actin, gamma-enteric smooth muscle C 102,01 F8WB63 Metabolismo Enzimática

POTE ankyrin domain family member F 102,01 A5A3E0 Metabolismo Enzimático

POTE ankyrin domain family member E 102,01 Q6S8J3 Metabolismo Enzimático

POTE ankyrin domain family member J 102,01 P0CG39 Metabolismo Enzimático

POTE ankyrin domain family member I 102,01 P0CG38 Metabolismo Enzimático

Actin, alpha skeletal muscle 102,01 P68133

Transporte

Processos celulares

Transporte de ATP

Respostas a hormônios

esteroidais

Actin, aortic smooth muscle 102,01 P62736

Processos celulares

E

Transporte
 Resposta viral
 Transporte de ATP
 Actin, alpha cardiac muscle 1 102,01 P68032
 Atividade ATPase Metabolismo
 E
 Transporte de ATP Transporte
 58

Tabela 4: Distribuição das proteínas identificadas no GCF de acordo com o processo e função biológica

Proteína	*espécie	Score	ID Uniprot	Processo	Função Biológica
Actin, cytoplasmic 1	102,01	C9JTX5	Estrutural	Composição celular	
Actin, cytoplasmic 2	208,53	P63261	Estrutural	Transporte	
			Citoesqueleto e Transporte de ATP		
Actin, gamma-enteric smooth muscle	102,01	B8ZZJ2	Metabolismo	Enzimático	
Actin, gamma-enteric smooth muscle C	102,01	F8WB63	Metabolismo	Enzimática	
POTE ankyrin domain family member F	102,01	A5A3E0	Metabolismo	Enzimático	
POTE ankyrin domain family member E	102,01	Q6S8J3	Metabolismo	Enzimático	
POTE ankyrin domain family member J	102,01	P0CG39	Metabolismo	Enzimático	
POTE ankyrin domain family member I	102,01	P0CG38	Metabolismo	Enzimático	
Actin, alpha skeletal muscle	102,01	P68133	Transporte de ATP		
			Respostas a		
			hormônios esteroidais		
Keratin, type I cytoskeletal 10	32,58	P13645	Transporte		
			Processos		
			Estrutural		
			Componente celular		
			Transporte		
			Transporte de		
			proteínas		
			59		
Keratin, type I cytoskeletal 15	27,45	P19012	Organização	Estrutural	
			citoesqueleto		
			Transporte		
			Transporte de		
			proteína		
Keratin, type II cytoskeletal 6A	779,29	P02538	Estrutural	Componente celular	
Keratin, type I cytoskeletal 12	44,95	Q99456	Estrutural	Componente celular	
Keratin, type II cytoskeletal 73	108,94	Q86Y46	Estrutural	Componente celular	

Keratin, type II cytoskeletal 6B 771,49 P04259 Estrutural Desenvolvimento
ectoderma
Keratin, type II cytoskeletal 78 24,89 Q8N1N4 Estrutural Componente celular
Keratin, type II cytoskeletal 2 oral 43,4 Q01546 Estrutural
Organização
citoesqueleto
Transporte de
proteínas
Keratin, type II cytoskeletal 4 102,57 P19013 Estrutural Componente celular
Keratin, type II cytoskeletal 5 610,56 P13647 Estrutural Organização
citoesqueleto
Keratin, type II cytoskeletal 74 24,89 F8W1S1 Estrutural Organização
citoesqueleto
Keratin, type II cytoskeletal 13 72,24 K7EMD9
Organização Estrutural
citoesqueleto
Transporte
Transporte de
proteínas
60
Keratin, type II cytoskeletal 75 523,29 O95678 Estrutural Componente celular
Keratin, type II cytoskeletal 6C 771,49 P48668 Estrutural Componente celular
Keratin, type II cytoskeletal 79 498,40 Q5XKE5
Componente celular
Transporte de
enzimas
Actin, aortic smooth muscle 102,01 P62736
Estrutural
Transporte
Processos
Transporte
Resposta viral e Transporte de ATP
Actin, alpha cardiac muscle 1 102,01 P68032
Metabolismo
Transporte
Atividade ATPase
Transporte de ATP
Beta-actin-like protein 2 752,70 Q562R1 Transporte Transporte de ATP
Putative beta-actin-like protein 3 412,41 Q9BYX7
Transporte de ATP
Degradação
plaquetária Transporte Transporte de metais Serum albumin 121,24 P02768
Estrutural Componente celular
Albumin_isoform CRA 121,4 C9JKR2 Organização Organização celular

Immunoglobulin heavy constant gamma1 105,08 A0A0A0MS08

Transporte

Metabolismo

Transporte

Processos

Transporte de

receptor imunológico

Immunoglobulin heavy constant gamma 78,74 A0A0A0MS07 Transporte

Transporte de

receptor imunológico

61

Processos
a bactérias Gram +/-

Neutrophil defensin 3 453,97 P59666

Respostas de defesa

Neutrophil defensin 1 453,97 P59665 Processos Respostas de defesa

Processos
antifúngicas antibacterianas.

Neurofilament heavy polypeptide 24,89 P12036

Componente celular

Transporte de

proteínas

Metabolismo
Inibidor de endopeptidase

Lactotransferrin 44,33 E7EQB2

Estrutural

Transporte

Respostas

Transporte

Transporte de metais

Transporte de metais

Tabela 5: Proteínas identificadas no
GC de acordo com o tipo de biofilme

Proteína *espécie *homo sapiens* Score ID Uniprot B1 B2

62

Actin, cytoplasmic 1 87,29 C9JTX5 Não Sim

Actin, cytoplasmic 2 130,83 P63261 Não Sim

Actin, gamma-enteric smooth muscle 87,29 B8ZZJ2 Não Sim

Actin, gamma-enteric smooth muscle C 87,29 F8WB63 Não Sim

POTE ankyrin domain family member F 87,29 A5A3E0 Não Sim

POTE ankyrin domain family member E 87,29 Q6S8J3 Não Sim

POTE ankyrin domain family member J 87,29 P0CG39 Não Sim

POTE ankyrin domain family member I 87,29 P0CG38 Não Sim

Actin, alpha skeletal muscle 87,29 P68133 Não Sim

Actin, aortic smooth muscle 87,29 F6QUT6 Não Sim

Keratin, type I cytoskeletal 13 124,48 P13646 Não Sim

Keratin, type I cytoskeletal 10 32,58 P13645 Não Sim

63

Keratin, type I cytoskeletal 15 27,45 P19012 Não Sim

Keratin, type II cytoskeletal 6A 779,29 P02538 Não Sim

Keratin, type I cytoskeletal 12 44,95 Q99456 Não Sim

Keratin, type II cytoskeletal 73 108,94 Q86Y46 Não Sim

Keratin, type II cytoskeletal 6B 771,49 P04259 Não Sim

Keratin, type II cytoskeletal 78 24,89 Q8N1N4 Não Sim

P19013

Keratin, type II cytoskeletal 4 102,57

Não Sim

Keratin, type II cytoskeletal 5 585,66 H0YIN9 Não Sim

Keratin, type II cytoskeletal 2 541,81 P35908 Não Sim

Keratin, type II cytoskeletal 74 24,89 F8W1S1 Não Sim

Keratin, type II cytoskeletal 75 523,29 O95678 Não Sim

Keratin, type II cytoskeletal 6C 771,49 P48668 Não Sim

Keratin, type II cytoskeletal 79 498,40 Q5XKE5 Não Sim
64

Keratin, type II cytoskeletal 2 oral 43,4 Q01546 Não Sim

Serum albumin 121,24 B7WNR0 Não Sim

Albumin_isoform CRA 121,4 C9JKR2 Não Sim

P12036

Neurofilament heavy polypeptide

P12036

24

Não

,

Não

,

Não

89

Não

89

Não

89

Sim

P12036

Sim

P12036

Sim

Sim
Sim
65

Sim

Tabela 6: Proteínas identificadas no GSF de com o tipo de biofilme

Proteína *espécie *homo sapiens* Score ID Uniprot B1 B2

Actin, cytoplasmic 1 102,01 C9JTX5 Sim Não

Actin, cytoplasmic 2 258,53 J3KT65 Sim Não

Actin, gamma-enteric smooth muscle 102,01 C9JFL5 Sim Não

Actin, gamma-enteric smooth muscle C 102,01 F8WB63 Sim Não

POTE ankyrin domain family member F 102,01 A5A3E0 Sim Não

POTE ankyrin domain family member E 102,01 Q6S8J3 Sim Não

POTE ankyrin domain family member J 102,01 P0CG39 Sim Não

POTE ankyrin domain family member I 102,01 P0CG38 Sim Não

Actin, alpha skeletal muscle 102,01 P68133 Sim Não

Actin, aortic smooth muscle 102,01 P62736 Sim Não

66

Actin, alpha cardiac muscle 1 102,01 P68032 Sim Não

Tabela 7: Proteínas identificadas no GCF de acordo com o tipo de biofilme

Proteína *espécie *homo sapiens* Score ID Uniprot B1 B2

Actin cytoplasmic 2 2186,4 P63261 Não Sim

Keratin type II cytoskeletal 75 502,4 O95678
Sim Sim

Immunoglobulin heavy constant gama OS 105,08 P01857 Não Sim

Immunoglobulin heavy constant gama (fragment) 105,08 A0A0A0MS08 Não Sim

Keratin type I cytoskeletal 13 191,41 K7ERE3 Não Sm

Keratin type II cytoskeletal 79 488,27 Q5XKE5 Sim Sim

Keratin type II cytoskeletal 5 914,19 P13647 Sim Sim

Keratin type I cytoskeletal 10 14,41 P13645 Não Sim

Keratin type II cytoskeletal 73 58,47 H0YIC5 Não Sim

Neutrophil defensin 3 453,97 P59666 Não Sim
67

Neutrophil defensin 1 453,97 P59665 Não Sim

Putative beta actin like protein 3 412,41 Q9BYX7 Não Sim

Keratin type II cytoskeletal 6B 665,51 P04259 sim Sim

Actin aortic smooth muscle 2340,5 P62736 Não Sim

Keratin type II cytoskeletal 2 epidermal 523,35 P35908 Sim Sim

POTE ankyrin domain family member J 359,1 P0CG39 não Sim

POTE ankyrin domain family member I 696,35 P0CG38 não Sim

Keratin type II cytoskeletal 6C 725,8 P48668 sim Sim

Keratin type II cytoskeletal 74 14,2 F8W1S1 não Sim

Neurofilament heavy polipeptide 14,2 P12036 não Sim

Keratin type II cytoskeletal 2 oral 35,08 Q01546 não Sim

Keratin type II cytoskeletal 6a 725,8 P02538 sim Sim

POTE ankyrin domain family member E 1108,76 Q6S8J3 não Sim

Lactotransferrin 44,33 P02788 não Sim
68

Keratin type II cytoskeletal 78 14,2 Q8N1N4 não Sim

Actin alpha skeletal muscle 2462,07 P68133 não sim

Actin alpha cardiac muscle 1 2340,5 P68032 não sim

Actin cytoplasmic 1 2186,46 P60709 não sim

Albumin isoform CRA 481,26 C9JKR2 não sim

Keratin type I cytoskeletal 12 40,31 Q99456 Não sim

POTE ankyrin domain family member F 1108,76 A5A3E0 Não sim

Beta-actin-like protein 2 752,7 Q562R1 Não sim

Actin gamma-enteric smooth muscle 1128,89 C9JFL5 Não sim

Serum albumin 527,39 P02768 Não sim

Keratin type II cytoskeletal 5 75,94 F8VU69 Não sim

Keratin type II cytoskeletal 4 65,14 P19013 Não sim

Keratin type I cytoskeletal 15 57,15 P19012 Não sim
69

Tabela 8: Identificação individual da amostra 7 pertencente ao GSF – Biofilme espesso
- escore cárie 1 – atividade de cárie presente

Proteína *espécie *homo sapiens* ID Uniprot Processo Biológico Função Biológica

Keratin, type II cytoskeletal 6C P48668 Estrutural Componente celular

Keratin, type II cytoskeletal 6 B P04259 Estrutural Desenvolvimento do
ectoderma

Keratin, type II cytoskeletal 6 A P02538 Estrutural Componente celular

Keratin, type II cytoskeletal 2 P35908

Estrutural

Transporte

Organização citoesqueleto

Transporte de proteínas

Keratin, type II cytoskeletal 79 Q5XKE5

Estrutural

Transporte

Componente celular

Transporte de proteínas

Keratin, type II cytoskeletal 75 O95678 Estrutural Componente celular

Keratin, type II cytoskeletal 5 P13647 Estrutural Organização citoesqueleto

Keratin, type I cytoskeletal 13 P13646

Estrutural

Transporte

Organização citoesqueleto

Transporte de proteínas

Keratin, type I cytoskeletal 12 Q99456 Estrutural Componente celular

70

Keratin, type I cytoskeletal 15 P19012

Estrutural
Organização citoesqueleto

Estrutural

Transporte
Transporte de proteínas

Componente
Transporte

Keratin, type I cytoskeletal 10 P13645
Componente celular
transporte de proteínas

Estrutural

celular

Keratin, type II cytoskeletal 4 P19013
Estrutural
Estrutural

Keratin, type II cytoskeletal 2 Oral Q01546
Componente

celular

Keratin, type II cytoskeletal 6A P02538 Estrutural Componente celular

Keratin, type II cytoskeletal 6C P48668 Estrutural Componente celular

Keratin, type II cytoskeletal 6B P04259 Estrutural Desenvolvimento ectoderma

Keratin, type II cytoskeletal 5 P13647 Estrutural Organização citoesqueleto

Keratin, type II cytoskeletal 2 P35908
Estrutural

Organização citoesqueleto

Transporte

Transporte de proteínas

Keratin, type II cytoskeletal 75 O95678 Estrutural Componente celular
71

Transporte
Transporte de proteínas

Keratin, type II cytoskeletal 79 Q5XKE5
Estrutural
Componente celular

Keratin, type I cytoskeletal 13 P13646
Estrutural

Transporte
Organização citoesqueleto

Transporte de proteínas

Keratin, type I cytoskeletal 12 Q99456 Estrutural Componente celular

Keratin, type II cytoskeletal 4 P19013 Estrutural Componente celular

Keratin, type II cytoskeletal 2 Oral Q01546 Estrutural Organização citoesqueleto

Keratin, type I cytoskeletal 15 P19012
Estrutural

Componente celular

Transporte

Transporte de proteínas

Keratin, type II cytoskeletal 74 Q7RT57 Estrutural Componente celular

Keratin, type II cytoskeletal 78 Q8N1N4 Estrutural Componente celular

Neurofilament heavy polypeotide P12036
Estrutural

Componente celular

Transporte
72

Transporte de proteínas

Tabela 9: Identificação individual da amostra 16 pertencente ao GSF – Biofilme fino -
escore cárie 0 – sem atividade de cárie

Proteína *espécie *homo sapiens* ID Uniprot **Processo**

Biológico **Função Biológica**

Actyn cytoplasmatic 1 P60709 Estrutural Componente celular
Actyn cytoplasmatic 2 P63261 Estrutural Componente celular
POTE ankyrin domain family member E Q6S8j3 Metabolismo Enzimático
POTE ankyrin domain family member j P0CG39 Metabolismo Enzimático
Actin, aortic smooth muscle P62736
Metabolismo
Processos
celulares
Transporte
Enzimático
Resposta Viral
Transporte de ATP
Actin, gamma-enteric smooth muscle P63267 Metabolismo Enzimático

Actin, alpha cardiac muscle P68032

Metabolismo

Transporte

Atividade ATPase

Transporte de ATP

Actin, alpha skeletal muscle P68133

Transporte

Processos

celulares

Transporte de ATP

Resposta viral

POTE ankyrin domain family member F A5A3E0 Metabolismo Enzimático

73

POTE ankyrin domain family member I P0CG38 Metabolismo Enzimático

Tabela 10 : Identificação individual da amostra 29 pertencente ao GC – Biofilme fino -
escore cárie 0 - sem atividade de cárie

Proteína *espécie *homo sapiens* ID Uniprot Processo

Biológico Função Biológica

Keratin, type II cytoskeletal 6C P48668 Estrutural Componente celular

Keratin, type II cytoskeletal 6B P04259 Estrutural Desenvolvimento do ectoderma

Keratin, type I cytoskeletal 6A P02538 Estrutural Componente celular

Keratin, type II cytoskeletal 2 P35908

Estrutural

Transporte

Organização do citoesqueleto

Transporte proteínas

Keratin, type II cytoskeletal 79 Q5XKE5

Estrutural transporte

Componente celular

Transporte proteína

Keratin, type II cytoskeletal 75 O95678 Estrutural Componente celular

Keratin, type II cytoskeletal 5 P13647 Estrutural Componente celular

74

Tabela 11 : Identificação individual da amostra 32 pertencente ao GC – Biofilme
espesso 2 - escore cárie 1 – com atividade de cárie

Proteína *espécie *homo sapiens* ID Uniprot Processo Biológico Função Biológica

Keratin, type II cytoskeletal 6C P48668 Estrutural Componente celular

Keratin, type II cytoskeletal 6B P04259 Estrutural Desenvolvimento do ectoderma

Keratin, type I cytoskeletal 6A P02538 Estrutural Componente celular

Keratin, type II cytoskeletal 2 P35908
Estrutural

Transporte
Organização do citoesqueleto

Keratin, type II cytoskeletal 79 Q5XKE5
Estrutural transporte
Componente celular

Transporte proteínas

Transporte proteína

Keratin, type II cytoskeletal 75 O95678 Estrutural Componente celular

Keratin, type II cytoskeletal 5 P13647 Estrutural Componente celular

Actin aortic muscle P62736
Metabolismo

Resposta Viral
Resposta Viral

Processos celulares
Enzimático

Transporte
Transporte de ATP

Actin gamma enteric muscle P3267 Metabolismo Enzimático
75

Actin cytoplasmic 1 P60709 Estrutural Componente celular

Actin cytoplasmic 2 P63261 Estrutural Componente celular

POTE ankyrin domain family member E Q6S8J3 Metabolismo Enzimático

POTE ankyrin domain family member F A5A3E0 Metabolismo Enzimático

POTE ankyrin domain family member I P0CG38 Metabolismo Enzimático

Serum Albumin P02768

Transporte

Transporte de metais

Organização

Organização celular

Albumin_isoform C9JKR2 Organização Organização celular

POTE ankyrin domain family member J P0CG39 Metabolismo Enzimática

Beta actin like protein 2 Q562R1 Transporte Transporte de ATP

Keratin, type II cytoskeletal 13 P13646

Estrutural

Degradação plaquetária

Transporte

Organização citoesqueleto

Keratin, type I cytoskeletal 15 P19012

Transporte

Transporte de proteínas

Estrutural

Putative Beta actin like protein 3 Q9BYX7

Transporte de ATP

Transporte

Organização citoesqueleto

Metabolismo

Transporte de ATP

76

Keratin, type II cytoskeletal 4 P19013 Estrutural Componente celular

Keratin, type I cytoskeletal 12 Q99456 Estrutural Componente celular

Keratin, type I cytoskeletal 2 Oral Q01546 Estrutural Componente celular

Componente celular

Transporte de proteínas

Keratin, type I cytoskeletal 10 P13645

Estrutural transporte

Keratin, type II cytoskeletal 78 Q8N1N4 Estrutural Componente celular

Neurofilament heavy polypeptide P12036

Estrutural

Transporte
Componente celular

Putative Beta actin like protein 3 Q9BYX7
Transporte Metabolismo
Transporte de ATP

Transporte de proteínas

Degradação plaquetária

Actin, alpha cardiac muscle P68032

Metabolismo

Serum Albumin P02768

Transporte
Transporte de Metais

Transporte
Atividade ATPase

Organização
Organização celular

Transporte de ATP

Actin alpha skeletal muscle P68133

Transporte

Keratin, type II cytoskeletal 2 P35908
Estrutural

Processos celulares
Transporte de ATP

Transporte
Organização citoesqueleto

Resposta viral

77

Transporte de proteínas

Albumin_isoform C9JKR2 Organização Organização celular

POTE ankyrin domain family member J P0CG39 Metabolismo Enzimático

Keratin, type I cytoskeletal 15 P19012

Estrutural

Componente celular

Transporte

Transporte de proteínas

Keratin, type I cytoskeletal 12 Q99456 Estrutural Componente celular

Keratin, type II cytoskeletal 74 Q7RT57 Estrutural Componente celular

Neutrophil defensin 1 P5966 Processos celulares Respostas de defesa a bactérias gram +/-

Neutrophil defensin 2 P5965 Processos celulares Respostas de defesa a bactérias

Immunoglobulin heavy constant gamma 1 P01857

Transporte Transporte de Proteínas

Processos celulares Receptor imunológico

Keratin, type II cytoskeletal 73 Q86Y46 Estrutural Componente celular

Neurofilament heavy polypeptide P12036

Estrutural Transporte

Transporte Processos celulares

Componente celular

Metabolismo

Transporte de proteínas Transporte de metais

78

Respostas antibacteriana e antifúngicas

Lactotransferrin P02788

Inibidor de endopeptidase

79

5. DISCUSSÃO

A HMI é uma alteração de desenvolvimento do esmalte que foi descrita pela primeira vez na literatura apenas em 2001 [4,15]. Porém, devido à significativa

prevalência reportada [21,22], e ao impacto desta sob diferentes perspectivas na vida da criança [6,8,15,17,24,26], vários estudos vêm sendo conduzidos para tentar elucidar questões referentes à sua etiologia, evolução da condição clínica, suscetibilidade ao desenvolvimento de lesões cariosas e o controle da progressão desta para estágios mais avançados. Entretanto, esta pesquisa é a primeira que buscou associar a análise proteômica do biofilme dos dentes afetados ou não por HMI, possibilitando uma investigação mais acurada da condição bioquímica do biofilme de dentes que apresentam diferentes situações clínicas num modelo *in vivo*. De maneira geral, nossos resultados não são conclusivos para afirmar se a presença da HMI influencia ou não na composição do biofilme dentário. Embora, observou-se que o biofilme espesso, tanto para dentes acometidos ou não pelo problema, expressam proteínas diferentes daquelas observadas no biofilme fino.

O estudo bioquímico do biofilme geralmente é conduzido *in vitro*, o que confere condições controladas, isoladas de variáveis e fatores confundidores. O biofilme analisado nesta pesquisa derivou de material coletado de dentes afetados ou não por HMI, considerando as condições reais nas quais as crianças se apresentaram para o exame clínico. Sabe-se que a dieta e os hábitos de higiene bucal são fatores que interferem na quantidade/qualidade do biofilme determinantes no processo de desenvolvimento da cárie [47], independente do dente estar ou não afetado por qualquer tipo de defeito de desenvolvimento do esmalte.

Em relação especificamente a dentes acometidos por HMI, já foi demonstrado que estes podem apresentar mais susceptibilidade ao desenvolvimento de cárie dentária [8] e que a HMI pode ser considerada um fator de risco para a doença [7]. Tal fato pode ser explicado pela característica do esmalte, já que dentes afetados por HMI

apresentam um conteúdo de mineral reduzido em relação ao esmalte sadio [17], o que diminui a dureza e a elasticidade da estrutura do esmalte [25] facilitando sua dissolução e o desgaste ou perda da estrutura do dente [47]. Este quadro pode levar a ocorrência de fraturas pós-eruptivas, acúmulo de biofilme e por consequência, o desenvolvimento da cárie [5,6,8,17]. Entretanto, até a presente data, não se sabe se

80

a qualidade do biofilme presente nessas regiões é afetada de alguma forma pela condição em si, além de que não se observou diferença na expressão de proteínas nos grupos com dentes afetados.

Assim, considerando que a cárie dentária é uma doença biofilme dependente (46), torna-se extremamente relevante o estudo deste quando se objetiva avaliar fatores associados à ocorrência da doença. Na presente investigação, decidiu-se categorizar o biofilme em fino e espesso, uma vez que o biofilme espesso, maduro na superfície dental é responsável pela transição de um estado de saúde para um estado de doença, pois possibilita a agregação de bactérias cariogênicas e periodontopatôgenicas, que serão responsáveis pela dissolução do esmalte dental e alterações gengivais, respectivamente [44].

Antes de discutir os achados referentes à análise proteômica é importante ressaltar que a literatura tem mostrado que a sacarose é o mais importante dos carboidratos fermentáveis, pois além de promover a queda do pH e seleção microbiana do biofilme dentário [48], é o substrato que promove a síntese de polissacarídeos extracelulares (PECs) [49,50]. Sabe-se que os PECs são importantes fatores de virulência dos principais microrganismos colonizadores da cavidade oral

[50], visto que evidências científicas têm demonstrado que os PECs interferem diretamente no processo de adesão e acúmulo de microrganismos orais, na estrutura do biofilme, maturação e no pH do biofilme dentário [51-54,37,38]. É importante ressaltar que esses fatores promovem mudanças na microbiota residente, mudanças metabólicas, fisiológicas e bioquímicas provocando assim o aumento da cariogenicidade do biofilme formado sobre as estruturas dentárias. Dentre as mudanças bioquímicas favoráveis no biofilme dentário, a baixa concentração de íons cálcio, fósforo e fluoreto tem sido associada à presença dos PECs [35,37,38,56-58]. Em adição, a concentração de íons no biofilme é considerada fator determinante na saturação da estrutura do biofilme, mantendo o equilíbrio mineral entre o fluido do biofilme e a superfície dentária, e com isso atuando diretamente no processo de des e remineralização (DES-RE) dos substratos dentários [57].

Na presente pesquisa foi observado a identificação de proteínas ligadoras de cálcio nas amostras de biofilme dentes afetados e não afetados, essas proteínas foram também observadas em outros estudos de biofilme, os quais relatam que a