

CENTRO UNIVERSITÁRIO SAGRADO CORAÇÃO

Lucas Bento Camargo Martins

Análise proteômica da película adquirida do esmalte in vivo e saliva sob o efeito do ciclo circadiano

BAURU

2023

Lucas Bento Camargo Martins

Análise proteômica da película adquirida do esmalte in vivo e saliva sob o efeito do ciclo circadiano

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como parte dos requisitos para obtenção do título de bacharel em Odontologia- Centro Universitário Sagrado Coração.

Orientador: Prof.^a Dr Otávio Pagin

BAURU

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com
ISBD

Martins, Lucas Bento Camargo

M379a

Análise proteômica da película adquirida do esmalte in vivo e saliva sob o efeito do ciclo circadiano / Lucas Bento Camargo Martins. -- 2023.

30f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Otavio Pagin

Coorientadora: Prof.^a Dra. Talita Mendes Oliveira Ventura

Elaborado por Lidyane Silva Lima - CRB-8/9602

Lucas Bento Camargo Martins

Análise proteômica da película adquirida do esmalte in vivo e saliva sob o efeito do ciclo circadiano

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como parte dos requisitos para obtenção do título de bacharel em Odontologia - Centro Universitário Sagrado Coração.

Aprovado em: ___/___/___.

Banca examinadora:

Prof.^a Dr. Otávio Pagin (Orientadora)
Centro Universitário Sagrado Coração

Prof.^a Dra Carolina Ortigosa Cunha
Centro Universitário Sagrado Coração.

Dedico este trabalho aos meus pais com amor e carinho.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, quero agradecer a Deus por me permitir realizar este grande sonho, por ter me dado esperança e forças nos momentos mais difíceis ao longo desta jornada.

Agradeço imensamente aos meus pais, **Leila e Leandro** que estiveram sempre presentes, e, por todo amor, incentivo e ajuda ao longo de minha vida. Em especial a minha mãe, que com o esforço de seu trabalho me proporcionou a oportunidade única de realizar este sonho.

Agradeço também a minha noiva **Vitoria**, que ao longo desta jornada sempre esteve presente e minha vida, me dando todo apoio e incentivo. Aos meus queridos avós Cacilda e Sirval, que sempre me colocaram em suas orações, agradeço por todo amor que sempre tiveram por mim ao longo de minha vida.

Agradeço também aos meus irmãos **Gabriel e Leonardo**, que sempre estiveram presente em minha vida.

Ao meu orientador **Prof. Dr. Otavio**, meus sinceros agradecimentos por todos os ensinamentos ao longo da graduação.

1 RESUMO

A película adquirida do esmalte (PAE) é um tegumento formado in vivo como resultado da adsorção seletiva de proteínas salivares sobre a superfície do dente, que contém ainda glicoproteínas e lipídeos. A presença de proteínas na PAE forma uma interface protetora sobre a superfície do dente, participando em todos os eventos interfaciais que ocorrem na cavidade bucal. Trata-se de um filme orgânico, livre de bactérias, que recobre os tecidos dentários, sendo um dos fatores protetores contra o desgaste dentário erosivo (DDE). Trabalhos têm se concentrado na caracterização e no impacto protetor da película adquirida formada sobre a superfície do esmalte. No entanto, pouco se sabe sobre a influência do ciclo circadiano nas alterações da composição proteica da película adquirida e saliva. Com base nisso, o objetivo deste trabalho será avaliar o efeito do ciclo circadiano no perfil proteico da saliva e da película adquirida formada sobre o esmalte in vivo. Participaram da pesquisa 9 voluntários, com idade acima de 18 anos, não fumantes, com bom estado de saúde geral e bucal. Após profilaxia, a película adquirida foi formada por 120 min. A coleta da PAE e saliva foram realizadas em três períodos distintos: formação das 8:00 às 10:00 h (período da manhã), formação das 14:00 às 16:00 h (período da tarde) e formação das 18:00 às 20:00 h (período da noite). Salivas não estimuladas e películas formadas em diferentes períodos (manhã, tarde e noite) foram coletadas separadamente para análise utilizando papel filtro embebido em ácido cítrico 3%. As amostras foram processadas para análise por nLC-ESI-MS/MS. Os espectros MS/MS obtidos foram confrontados com bases de dados de proteínas humanas (SWISS-PROT). A quantificação livre de marcadores foi realizada utilizando o software PLGS. Os fluxos salivares e o pH da saliva também serão avaliados nos diferentes períodos.

Palavras-chave: Película adquirida; Saliva; Ritmo circadiano; Proteínas; Erosão dentária; Proteômica

The acquired enamel pellicle (AEP) is an *in vivo* tegument formed as a result of the selective adsorption of salivary proteins onto the tooth's surface, which also includes glycoproteins and lipids. The presence of proteins in the AEP establishes a protective interface on the tooth's surface, actively participating in all interfacial events occurring within the oral cavity. It constitutes an organic, bacteria-free film that envelops dental tissues, serving as one of the protective factors against erosive dental wear (DDE). Previous research efforts have primarily focused on characterizing and assessing the protective impact of the acquired enamel pellicle formed on the enamel's surface.

However, there remains limited understanding regarding the influence of the circadian rhythm on alterations in the protein composition of the acquired pellicle and saliva. Based on this premise, the objective of this study is to evaluate the circadian rhythm's effect on the protein profile of both saliva and the acquired enamel pellicle formed *in vivo*. The study included nine volunteers aged 18 and above, who were non-smokers and exhibited good overall oral and general health. After prophylaxis, the acquired enamel pellicle was formed over a 120-minute period.

The collection of both AEP and saliva samples took place during three distinct time intervals: from 8:00 to 10:00 AM (morning period), from 2:00 to 4:00 PM (afternoon period), and from 6:00 to 8:00 PM (evening period). Unstimulated salivary samples and pellicles formed at different times (morning, afternoon, and evening) were collected separately for subsequent analysis using filter paper soaked in 3% citric acid. The collected samples underwent processing for nLC-ESI-MS/MS analysis. The MS/MS spectra obtained were cross-referenced with human protein databases (SWISS-PROT). Marker-free quantification was conducted using the PLGS software. Additionally, salivary flow rates and saliva pH were assessed across the various time periods.

Keywords: Acquired enamel pellicle; Saliva; Circadian rhythm; Proteins; Dental erosion; Proteomics.

Sumário

1	RESUMO.....	18
2	ABSTRACT	19
3	INTRODUÇÃO	21
4	OBJETIVO.....	21
5	MATERIAL E MÉTODOS	22
5.1	PARTICIPANTES.....	22
5.2	COLETAS.....	23
5.3	COLETA DE PELICULA DQUIRIDA DO ESMALTE	24
5.4	ANÁLISE PRÔTEOMICA	25
5.5	ANÁLISE	12
6	AQUISIÇÃO NANOLC-ESI-MS/MS.....	15
6.1	QUANTIFICAÇÃO PROTEÔMICA LIVRE DE MARCADORES E ANÁLISE DE BIOINFORMÁTICA.....	15
7	ANÁLISE ESTATÍSTICA	16
7.1	RESULTADOS E ANÁLISE.....	16
8	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	26
9	REFERÊNCIAS	26

3 INTRODUÇÃO

Inicialmente, o presente projeto de pesquisa foi enviado ao Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos para sua devida aprovação antes de iniciarmos o recrutamento dos voluntários. Após a aprovação, foi realizado o recrutamento de todos os voluntários (n. 9) de ambos os gêneros (5 homens e 4 mulheres) para o início da pesquisa.

Os voluntários foram selecionados meticulosamente segundo os critérios de inclusão e exclusão. Sendo assim, no período do presente relatório, foram realizadas todas as coletas de película adquirida do esmalte (PAE), salivas não estimuladas (SNE) e avaliação dos fluxos salivares e pH, conforme os grupos e os tempos de coletas propostos. As amostras foram armazenadas no freezer -80°C até o término de todas as coletas e até o início da análise proteômica. Foi realizada a análise proteômica de todos os grupos, tanto para a PAE quanto para a saliva não estimulada (películas e salivas do período da manhã; películas e salivas do período da tarde e películas e salivas do período da noite), uma vez que para análise proteômica, todas as amostras precisam ser preparadas e analisadas no mesmo momento devido à análise quantitativa (expressão diferencial), para que assim seja realizada a comparação entre os grupos. Após o preparo das amostras na análise proteômica, as mesmas se encontram congeladas no freezer -20°C até o processamento para identificação pelo espectrômetro de massas. É importante destacar que as amostras foram congeladas devido que o equipamento em nosso laboratório possui uma fila de projetos de pesquisa a ser respeitada, sendo que as amostras do presente projeto de pesquisa serão as próximas a serem processadas para identificação.

4 OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do ciclo circadiano no perfil proteômico de películas adquiridas formadas sobre o esmalte in vivo e da saliva total não estimulada. Este perfil foi avaliado de películas e salivas coletadas de manhã, à tarde e à noite, a fim de se

verificar as alterações no proteoma da película adquirida, bem como explicar os mecanismos envolvidos nessas alterações relacionados com a saliva.

Pretendemos responder às seguintes perguntas:

- O ciclo circadiano interfere na composição proteica da saliva total não estimulada e de películas adquiridas formadas sobre o esmalte in vivo?

Para responder a estas perguntas, empregamos a seguinte ferramenta: análise proteômica label-free por nLC-ESI-MS/MS para avaliação da composição proteica da película adquirida do esmalte (PAE) e da saliva in vivo.

5 MATERIAL E MÉTODOS

Aspectos Éticos O protocolo deste projeto foi submetido à aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Faculdade de Odontologia de Bauru – FOB/USP (CAAE 64542322.2.0000.5417). Os participantes iniciaram somente após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Além disso, para a coleta da película adquirida do esmalte e saliva, foram seguidos os procedimentos de biossegurança que constam no “Manual de Prevenção e Controle de Infecção pelo Novo Coronavírus” da FOB-USP.

Delineamento A película adquirida do esmalte (PAE) foi formada pelo tempo de 120 min. A saliva não estimulada (SNE) e a PAE foram coletadas de cada participante que apresentaram boa saúde geral e bucal em três períodos distintos, originando 3 grupos, a saber:

- Início da formação da PAE às 8:00 e coleta às 10:00 h (período da manhã);
- Início da formação da PAE às 14:00 e coleta às 16:00 h (período da tarde);
- Início da formação da PAE às 18:00 e coleta às 20:00 h (período da noite).

5.1 PARTICIPANTES

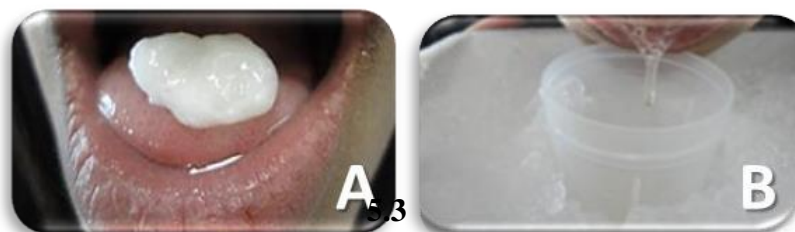
Nove participantes com boa saúde geral e bucal, ou seja, não fumantes, sem cárie, gengivite, periodontite ou outra condição bucal que poderia afetar a composição dos fluidos orais, bem como que não estavam fazendo uso de medicamentos, drogas ou tabaco, com fluxo salivar estimulado > 1 mL/min, fluxo salivar não estimulado $> 0,25$ mL/min e pH salivar > 6 , foram incluídos no presente estudo. Participantes que apresentam fatores de risco para erosão dentária, como consumo excessivo de bebidas carbonatadas, frutas ou suco de frutas ácidas, que realizavam natação, ou que apresentaram desordens gástricas, como bulimia e refluxo gastroesofágico foram excluídos (Ventura, Cassiano et al. 2017). Os participantes tinham idade maior que 18 anos, foram de ambos os gêneros (5 homens e 4 mulheres) e consentiram voluntariamente com a participação. O fluxo salivar não estimulado e estimulado dos participantes foram aferidos antes do início de cada período de coleta e foi realizada ainda avaliação do pH salivar para o fluxo não estimulado e análise proteômica. O número de participantes foi escolhido com base em trabalhos prévios nos quais foi feita análise proteômica quantitativa da película adquirida coletada in vivo (Delecrode, Siqueira et al. 2015, Ventura, Cassiano et al. 2017, Cassiano, Ventura et al. 2018, Taira, Ventura et al. 2018, Martini, Rios et al. 2019). O tamanho da amostra foi calculado com MSstats (Choi, Chang et al. 2014), usando dados de nossos experimentos anteriores (Taira, Ventura et al. 2018, Carvalho, Araujo et al. 2020), considerando $\alpha = 0,05$ e $1-\beta = 0,8$. O tamanho do efeito (diferença na abundância de proteína) foi considerado como 1,5. O número estimado de amostras foi de 3/grupo. Considerando as baixas quantidades de proteínas tipicamente recuperadas do AEP in vivo, decidimos incluir 9 voluntários, a fim de constituir 3 pools, portanto as análises proteômicas foram realizadas em triplicatas biológicas.

5.2 COLETAS

As salivas foram coletadas, de cada voluntário, em três períodos distintos (estudo distinto), conforme descrito em 4.2.2, para verificar a influência do ciclo circadiano. A escolha pelo uso e coleta da saliva não estimulada foi realizada estritamente conforme descrito em estudos anteriores (Jasim, Olausson et al. 2016, Ventura, Ribeiro et al. 2018, Ventura, Santos et al. 2021). Os participantes foram orientados a não ingerirem bebidas e alimentos, exceto água, por 2 horas antes da coleta da saliva. Além disso, uma semana antes da coleta, foi fornecido um kit de higiene bucal, contendo uma escova, um creme dental e fio dental, a fim de padronização para o estudo. Para as coletas, os participantes enxaguaram a boca com 5 mL de água deionizada antes da coleta. Para a coleta da saliva não estimulada, os participantes cuspiram toda a saliva formada em tubos imersos em gelo por 10 min. Para a coleta da saliva

estimulada, os participantes mastigaram um Parafilm® (5 cm) e toda a saliva formada pela estimulação foi cuspidada em tubos imersos em gelo (Figura 1). Após a coleta, foi realizada a avaliação dos fluxos salivares, bem como do pH dos diferentes períodos. Logo após, as amostras foram centrifugadas a 4.500 g por 15 min a 4 °C para remover possíveis detritos, como material insolúvel, células e restos de alimentos. O sobrenadante de cada saliva foi coletado e congelado a -80 °C até a análise proteômica. Esses procedimentos foram baseados também em estudos anteriores (Pela, Buzalaf et al. 2021, Ventura, Santos et al. 2021).

Figura 1 Coleta da saliva estimulada e não estimulada. A) Estímulo mastigatório com parafilm® M – Sigma-Aldrich. B) Coleta das salivas em recipiente com gelo.



5.4

5.5 COLETA DE PELICULA DQUIRIDA DO ESMALTE

A coleta de PAE foi realizada, de cada voluntário, em cada um dos períodos descritos anteriormente (estudo cruzado), conforme descrito em 4.2.2. Os participantes receberam uma meticulosa profilaxia dentária com pedra pomes (não contendo aditivos). Em seguida, aguardaram por 120 minutos para que a película adquirida se formasse naturalmente sobre o esmalte dentário, para evitar possível agregação bacteriana, que poderia interferir nos resultados (Siqueira, Zhang et al. 2007). Durante este período de 120 minutos, os participantes foram privados do consumo de alimentos e bebidas. Após o período de 120 minutos, os quadrantes dos arcos dentários foram isolados, enxaguados com água deionizada e secos com jato de ar por duas vezes. A PAE foi então coletada com auxílio de um papel filtro de eletrodos (electrode wick filter paper, Bio-Rad, Hercules, CA) de 5X10 mm pré-mergulhado em ácido cítrico 3%. O papel filtro foi esfregado (sem pressão) sobre os dois terços coronais (para evitar contaminação da margem gengival) das superfícies dos dentes, nas regiões vestibulares, linguais e palatinas (Ventura, Cassiano et al. 2017), com auxílio de uma pinça (Siqueira, Zhang et al. 2007) (Figura 2). Os wick filters foram colocados em criotubos de 2 mL e armazenados a -80°C até a análise proteômica. Os filtros coletados de cada período de todos os participantes foram reunidos em um pool, totalizando 3 pools, correspondentes aos 3

grupos descritos acima. As coletas foram realizadas em 6 dias, sendo consecutivos a cada 3 dias (estudo cruzado conforme descrito em 4.2.2), e as amostras coletadas a cada dia foram reunidas no mesmo pool correspondente a cada grupo avaliado, a fim de assegurar quantidade suficiente de amostra para ser analisada.

Figura 2. Coleta da película adquirida do esmalte (PAE). Após a profilaxia com pedra pomes e o tempo de 120 min para formação da PAE, os dentes foram devidamente isolados a fim de evitar contaminação por saliva ou sulco gengival, secos e realizada a coleta da PAE.

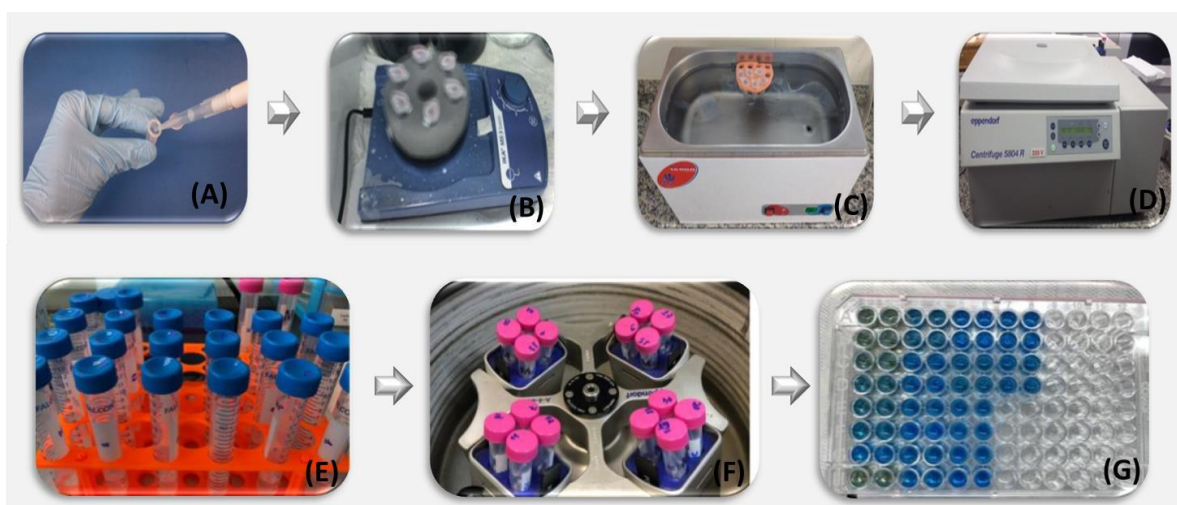


5.6 ANÁLISE PRÔTEOMICA

Preparo das amostras de saliva Para a análise proteômica da saliva não estimulada, as proteínas foram extraídas, seguindo o protocolo padronizado pelo nosso grupo de pesquisa (Ventura, Ribeiro et al. 2018). Para isto, foi utilizado 1 mL de saliva por indivíduo, os quais foram transferidos para novos tubos. As proteínas das amostras de saliva foram extraídas com um volume semelhante ao das amostras (1:1). Em seguida, 1 mL de uma solução de extração contendo 6 M de ureia, 2 M de tiouréia em 50 mM de NH_4HCO_3 a pH 7,8 foi adicionada nas amostras. As amostras foram colocadas no vórtex por 10 min a 4 °C, sonicadas por 5 min e centrifugadas a 20.817 xg por 10 min a 4 °C. Esses procedimentos de extração foram repetidos mais uma vez. Após a extração, foi adicionado NH_4HCO_3 50 mM (1,5 X volume da amostra), a fim de reduzir a concentração de uréia e tiouréia e evitar interferência na digestão. As amostras foram concentradas com tubos Amicon (Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Units - Merck Millipore®, Tullagreen, County Cork, Irlanda) e centrifugadas a 4.500 xg a 4 °C para um volume de aproximadamente 150 μL (Figura 3). As amostras foram então reduzidas (5 mM ditiotreitol, Bio Rad Laboratories, Canadá) e alquiladas (10 mM iodoacetamida, GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire Reino Unido). Em

sequência, 100 μ L de 50 mM NH_4HCO_3 , pH 7,8 foram adicionados e, em seguida, a digestão foi realizada por 14 h a 37 °C pela adição de 2% (p/p) de tripsina (Thermo Scientific Pierce Trypsin Protease, Rockford, IL, EUA). A digestão foi interrompida pela adição de solução de ácido fórmico a 5%. As amostras foram dessalinizadas e purificadas usando colunas de spin C18 (Thermo Scientific, Rockford, Illinois, EUA). Uma alíquota de cada amostra (1 μ L) foi retirada para a quantificação total dos peptídeos (Pierce™ Quantitative Peptide Assays & Standards, Thermo Scientific™) para a realização dos cálculos para a análise quantitativa e expressão diferencial. Todas as amostras foram congeladas a -20°C até o dia do processamento para identificação das amostras no nanoLC-ESI-MS/MS. Logo após as amostras foram ressuspensas em acetonitrila 3%, ácido fórmico 0,1% e padrão Enolase para o controle de qualidade da identificação e utilizado para aplicação no nanoLC-ESI-MS/MS.

Figura 3. A) adição nas amostras da solução de extração (6M de ureia, 2M de tiourea em 50mM de NH_4HCO_3 , pH 7,8); B) amostras em vórtex a 4°C; C) sonicação das amostras no ultrassom; D) centrifugação das amostras a 20,817 xg a 4°C por 10 min; E) diluição das amostras com 50mM de NH_4HCO_3 , pH 7,8; F) concentração das amostras.

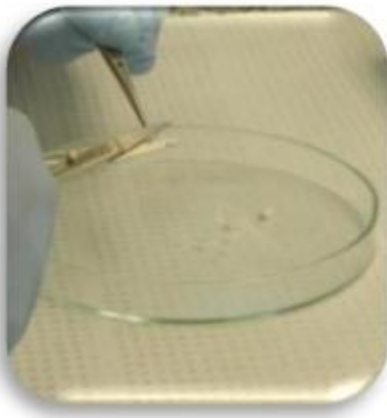


5.7 ANÁLISE

Preparo das amostras de película adquirida do esmalte O protocolo de extração foi padronizado pelo nosso grupo de pesquisa (Ventura, Cassiano et al. 2017) e as análises foram realizadas em triplicata biológica (Carvalho, Araujo et al. 2020, Ventura, Ribeiro et al. 2021). Para isto, amostras de cada 3 voluntários foram agrupadas (agrupadas também das coletas em duplicatas), de modo que 3 pools foram obtidos para cada grupo para que a análise proteômica fosse realizada em triplicatas biológicas (Tabela 1). Os papéis foram picotados segundo seus respectivos grupos (Figura 4). Aos tubos contendo os papéis foram adicionados volumes variados da solução de 6M de Urea, 2M Thiourea em 50 mM de NH_4HCO_3 pH 7,8 até que cobrissem todos os papéis picotados. As amostras foram colocadas no vórtex por 10 min a 4°C, realizada a sonicação por 5 min e centrifugadas a 20,817 g por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi coletado e este passo foi repetido por duas vezes, sendo adicionados aproximadamente 200 μL da solução em cada grupo, para uma perfeita recuperação da amostra. Então os papéis foram colocados em tubos filtro (Corning® Costar® Spin-X® Plastic Centrifuge Tube Filters) e centrifugados a 20,817 xg por 10 min a 4°C (Figura 5). O sobrenadante foi recuperado e agrupados para cada 3 voluntários, para obter triplicatas biológicas para cada grupo. Logo após uma parte e meia de 50 mM NH_4HCO_3 foi adicionado nas amostras. Este valor foi baseado no volume total das mesmas, para que a concentração de ureia e tiourea diminuisse, pois estas podem interferir na ação da tripsina. Na sequência, as amostras foram transferidas para tubos Amicon (Amicon Ultra -15 Centrifugal Filter Units - Merck Millipore) e centrifugadas a 4,500 g a 4°C, para um volume de aproximadamente 150 μL . A quantificação total de proteínas foi realizada pelo método de Bradford (Bio-Rad Bradford Assays, Hercules, Califórnia, EUA) (Figura 6A) e logo após, foi adicionado às amostras 5 mM de DTT (Bio- Rad Laboratories) e as mesmas foram incubadas a 37°C por 40 min. Após este período, foi adicionado 10 mM de Iodoacetamida (GE Healthcare) e as amostras foram incubadas por 30 min no escuro. Após as incubações foi realizada a digestão trípica por 14 h a 37°C pela adição de tripsina a 2% (p/p) (Thermo Scientific Pierce Trypsin Protease, Rockford, IL, USA). Depois de decorrido este tempo, foi adicionada a solução de ácido fórmico 5 % para cessar a ação da tripsina e realizar o procedimento com a coluna C18

spin (Thermo Scientific, Rockford, Illinois, USA, para a dessalinização e purificação das amostras (Figura 6B). Uma alíquota de cada amostra (1 μ L) foi retirada para a quantificação total dos peptídeos (Pierce™ Quantitative Peptide Assays & Standards, Thermo Scientific™) para a realização dos cálculos para a análise quantitativa e expressão diferencial. Todas as amostras foram congeladas a -20°C até o dia do processamento para identificação das amostras no nanoLC-ESI-MS/MS. Logo após as amostras foram ressuspendidas em acetonitrila 3%, ácido fórmico 0,1% e padrão Enolase para o controle de qualidade da identificação e utilizado para aplicação no nanoLC-ESI-MS/MS.

Figura 4. Papéis filtros utilizados nas coletas da PAE sendo picotados para a extração proteica.



Fonte próprio autor.

Figura 5. Procedimentos para a extração das proteínas da película adquirida do esmalte. A) Adição nas amostras da solução de extração; B) Amostras em vórtex a 4°C ; C) Sonicação das amostras no ultrassom; D) Centrifugação das amostras a 20.817 xg a 4°C ; E) Tubos filtros para recuperação das amostras que restaram nos papéis filtros.



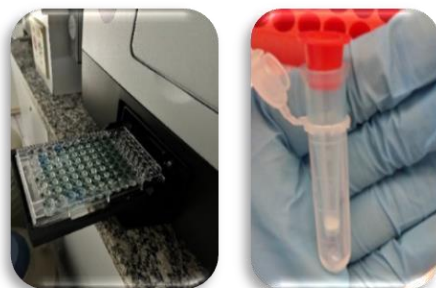
Tabela 1. Voluntários aleatorizados segundo os grupos para a constituição da triplicata biológica para a análise proteômica da película adquirida do esmalte.

GRUPOS	VOLUNTÁRIOS
Período da manhã	Voluntário 1, Voluntário 2, Voluntário 3
Período da manhã	Voluntário 4, Voluntário 5, Voluntário 6
Período da manhã	Voluntário 7, Voluntário 8, Voluntário 9
Período da tarde	Voluntário 1, Voluntário 2, Voluntário 3
Período da tarde	Voluntário 4, Voluntário 5, Voluntário 6
Período da tarde	Voluntário 7, Voluntário 8, Voluntário 9
Período da noite	Voluntário 1, Voluntário 2, Voluntário 3
Período da noite	Voluntário 4, Voluntário 5, Voluntário 6
Período da noite	Voluntário 7, Voluntário 8, Voluntário 9

Período da manhã (início da formação da PAE às 8:00 e coleta às 10:00 h); Período da tarde (início da formação da PAE às 14:00 e coleta às 16:00 h); Período da noite (início da formação da PAE às 18:00 e coleta às 20:00).

Figura 6. Quantificação proteica e purificação e dessalinização dos peptídeos.

A) Leitor de microplaca (espectrofotômetro) e quantificação total de proteínas pelo método de Bradford (Bio-Rad Bradford Assays, Estados Unidos). B) Coluna utilizada para a purificação e dessalinização dos peptídeos: Coluna C18 Spin (Thermo Scientific, Estados Unidos).



6 AQUISIÇÃO NANOLC-ESI-MS/MS

Para as análises dos peptídeos foi utilizado o espectrômetro de massas Xevo G2 (Waters) acoplado ao sistema nanoACQUITY (Waters). Todas as amostras foram analisadas em triplicata para as análises da PAE e salivas. O UPLC nanoACQUITY (Waters Corporation) é equipado com uma coluna analítica de fase reversa nanoACQUITY HSS T3 (75 μ M X 150 mm, tamanho de partícula de 1,8 μ m, Waters). A coluna foi equilibrada com a fase móvel A (ácido fórmico 0,1% em água). Então, os peptídeos foram separados com um gradiente linear de 7-85% da fase móvel B (ácido fórmico 0,1% em acetonitrila) por 70 min, a um fluxo de 0.35 μ L/min. A temperatura da coluna foi mantida em 55°C. O espectrômetro de massas Xevo G2 Q-TOF foi operado no modo iônico positivo nanoelectrospray e os dados foram coletados usando o método MSE em energia elevada (19-45 V), que permite a aquisição dos dados tanto dos íons precursores quanto fragmentos, numa única injeção. As condições de fonte incluíram: voltagem do capilar, 2.5 kV; cone de amostras, 30 V; Cone de extração, 5 V; e temperatura da fonte, 80°C. A aquisição dos dados ocorreu durante 90 min e a variação da varredura foi de 50-2000 Da. O lockspray, usado para assegurar acurácia e reprodutibilidade, foi operado com uma solução de [Glu1] fibrinopeptídeo (1 pmol/ μ L) a um fluxo de 1 μ L/min, com íon de referência no modo positivo a m/z 785.8427. O software ProteinLynx Global Server (PLGS) versão 3.0 foi utilizado para processar e pesquisar os dados LC-MSE contínuos. As proteínas foram identificadas utilizando o algoritmo de contagem de íons do software, sendo realizada pesquisa na base de dados Homo sapiens (revisado apenas, UniProtKB/Swiss-Prot) a partir do UniProtKB (<http://www.uniprot.org/>).

6.1 QUANTIFICAÇÃO PROTEÔMICA LIVRE DE MARCADORES E ANÁLISE DE BIOINFORMÁTICA

Para a análise quantitativa livre de marcadores, três arquivos brutos de MS de cada amostra de PAE e salivas foram processados utilizando o software Protein Lynx Global Service (PLGs, v 3.0, Waters Co., Manchester, UK). Todas as proteínas identificadas com score com confiança maior que 95% foram inclusas na análise quantitativa. Os peptídeos idênticos de cada triplicata por amostra foram agrupados de acordo com a precisão de massa (<10 ppm) e a tolerância de tempo de retenção <0,25 min, utilizando o software de agrupamento incluso no PLGS. A diferença de expressão entre os grupos foi analisada pelo teste t ($p < 0,05$) sendo p

$<0,05$ para as proteínas subreguladas e $1-p > 0,95$ para as proteínas superreguladas, usando o algoritmo MonteCarlo (Ventura, Cassiano et al. 2017, Taira, Ventura et al. 2018, Carvalho, Araujo et al. 2020, Ventura, Ribeiro et al. 2021). Foram realizadas as seguintes comparações relevantes: Noite vs Manhã, Tarde vs Manhã, Noite vs Tarde.

Proteínas repetidas, fragmentos e proteínas reversas foram avaliadas por revisão manual por seu número de acesso pelo UNIPROT e foram excluídas. As proteínas salivares e da PAE apresentadas em cada grupo (Noite vs. Manhã, Tarde vs. Manhã e Noite vs. Tarde.) foram comparadas e classificadas de acordo com a expressão diferencial. A análise de bioinformática foi realizada utilizando o banco de dados STRING (<http://string-db.org>) para a análise da rede de interação das proteínas. O número de acesso das proteínas foi fornecido pela UNIPROT e as análises foram realizadas em todas as comparações relevantes mencionadas acima. Ademais, após a obtenção dos dados proteômicos, os dados foram depositados no repositório ProteomeXchange através do repositório parceiro PRIDE, disponível em <http://www.proteomexchange.org/>.

7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

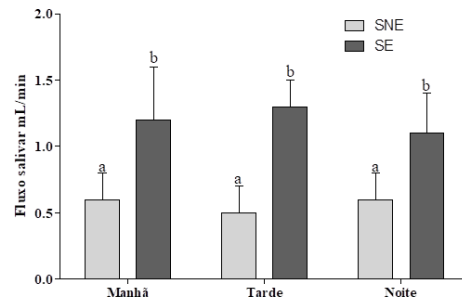
Inicialmente, os dados dos fluxos salivares foram verificados quanto à normalidade com o teste de Kolmogorov-Smirnov e homogeneidade com o teste de Bartlett. Foi realizado um teste de ANOVA a 2 critérios e teste post-hoc de Bonferroni ($p < 0,05$) para verificar as diferenças entre os fluxos salivares estimulados (SE) e fluxos salivares não estimulados (SNE), bem como a diferença de formação nos 3 diferentes períodos do dia (manhã, tarde e noite). Todas as análises estatísticas consideraram nível de significância de 0,05 e os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão.

7.1 RESULTADOS E ANÁLISE

O fluxo salivar médio (\pm DP) não estimulado foi de $0,59 \pm 0,20$, $0,46 \pm 0,23$ e $0,63 \pm 0,24$ mL/min para os períodos da manhã, tarde e noite, respectivamente, e o fluxo salivar médio estimulado foi de $1,18 \pm 0,38$, $1,33 \pm 0,22$ e $1,13 \pm 0,25$ mL/min para os períodos manhã, tarde e noite, respectivamente. O teste ANOVA a 2 critérios revelou que não houve diferença entre os diferentes períodos (manhã, tarde e noite) dos fluxos salivares coletados nos três períodos

distintos ($p=0,22$), porém houve diferença entre os diferentes tipos de fluxos salivares: estimulados e não estimulados ($p<0,0001$), o que já era esperado. Não houve interação entre os fatores ($p=0,80$), o que mostra que o ciclo circadiano não afetou a produção de saliva tanto estimulada quanto não estimulada nos três períodos distintos coletados (Figura 7). Além disso, o pH salivar foi aferido nos três períodos, entretanto, não houve variação entre os fluxos salivares e os períodos de coleta em relação ao pH salivar, sendo que todos apresentaram em média entre pH 6,0 - 7,0.

Figura 7. Média do fluxo salivar não estimulado (SNE) e estimulado (SE) dos voluntários saudáveis nos três períodos: manhã, tarde e noite. Letras diferentes denotam diferenças significativas entre os fluxos salivares e os diferentes períodos de coleta. ANOVA a 2 critérios e teste post-hoc de Bonferroni ($p < 0,05$). $n = 9$



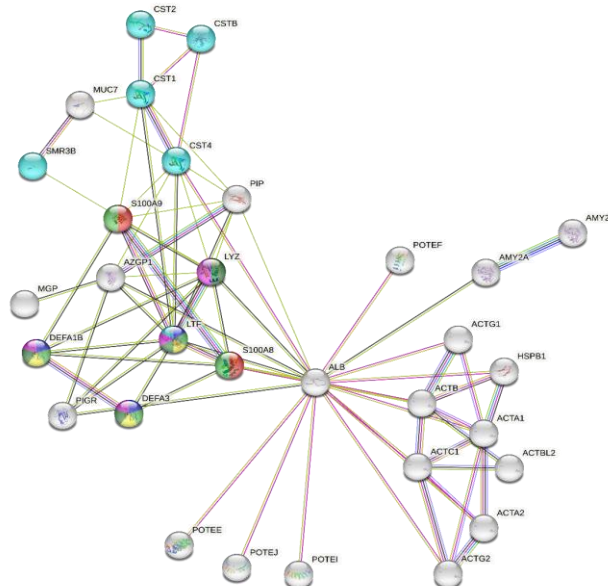
Foi realizado ainda o preparo das amostras de PAE e das SNEs para a análise proteômica. Dentre os resultados parciais obtidos, foram realizadas as análises da quantificação total de peptídeos após a digestão. Esta análise é de extrema importância, uma vez que a análise quantitativa da expressão diferencial das proteínas dos diferentes grupos foi proposta inicialmente no estudo. Sendo assim, antes das amostras serem processadas no espectrômetro de massas, todas foram quantificadas após a purificação das amostras com a coluna C18 Spin, afim de deixar todas as amostras na mesma quantidade de μg , para que assim a expressão diferencial pudesse ser realizada e os grupos serem comparados entre si e sem ocorrer possíveis interferências de diferença de quantidade total de peptídeos.

A quantidade de peptídeos final obtidas em cada amostra de PAE variou de 76 μg /peptídeos para o período da manhã, 60 μg /peptídeos para o período da tarde e 45 μg /peptídeos para o período da noite. A figura 8 mostra os diagramas de Venn com os números de proteínas expressas nos três períodos avaliados (manhã, tarde e noite), incluindo proteínas comuns e proteínas exclusivas de cada grupo.

Em relação a análise proteômica da PAE, na comparação Noite vs. Manhã, os números totais de proteínas identificadas foram de 61 e 47, respectivamente, dentre as quais 42

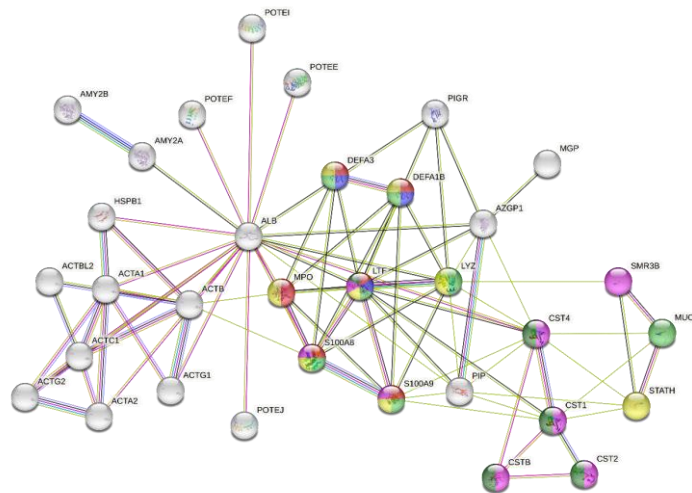
proteínas eram comuns a ambos os grupos. Dezenove proteínas foram exclusivas do grupo Noite, dentre elas destacamos duas isoformas de cistatinas (Cystatin-C e D), Carbonic anhydrase 6, Histatin- 3, Proline-rich protein 27 e 10 isoformas de imunoglobulinas, enquanto 5 proteínas foram exclusivas no período da Manhã. Vinte e três proteínas estavam aumentadas no período da noite, destacando importantes proteínas típicas da película adquirida como 5 isoformas de alpha amilases (aumentadas mais que 8 vezes), 3 isoformas de cistatinas (aumentadas mais que 2 vezes), 4 isoformas de imunoglobulinas, Lysozyme C (aumentada mais que 4 vezes), Submaxillary gland androgen-regulated protein 3B, Mucin-7, Albumin, Lactotransferrin e Protein S100-A9. Dezesete proteínas foram subreguladas no período da noite em comparação com a manhã, destacando a proteína Protein S100-A8, Neutrophil defensin 1 e 3 e Cystatin-B (Anexo 1 - Tabela S1, em Outros Documentos no SAGE, Figura 8).

Figura 9. Redes de interação entre proteínas up-regulated e down-regulated identificadas na película adquirida do esmalte em cada grupo. Comparação **Noite x Manhã**. Proteínas marcadas de acordo com Processos Biológicos que merecem destaque, seguidas pelo valor *False Discovery Rate* (FDR): a cor verde dos nós: resposta de defesa a fungo, FDR <0,001, a cor azul dos nós: resposta imune inata a mucosa, FDR = 0,004, a cor amarela dos nós: resposta humoral antimicrobiana, FDR = 0,02, a cor vermelha dos nós: agregação de neutrófilos, FDR = 0,004, a cor rosa dos nós: resposta de defesa contra bactérias Gram- positivas, FDR = 0,009 e a cor verde escura dos nós: resposta de defesa contra bactérias Gram-negativas, FDR = 0,005. Proteínas marcadas de acordo com processos envolvidos com a Função Molecular que merecem destaque seguidas pelo valor *False Discovery Rate* (FDR): a cor azul claro dos nós: atividade inibidora de endopeptidase, FDR <0,001. A análise da rede de interação de proteínas usando o banco de dados STRING (<http://string-db.org>).



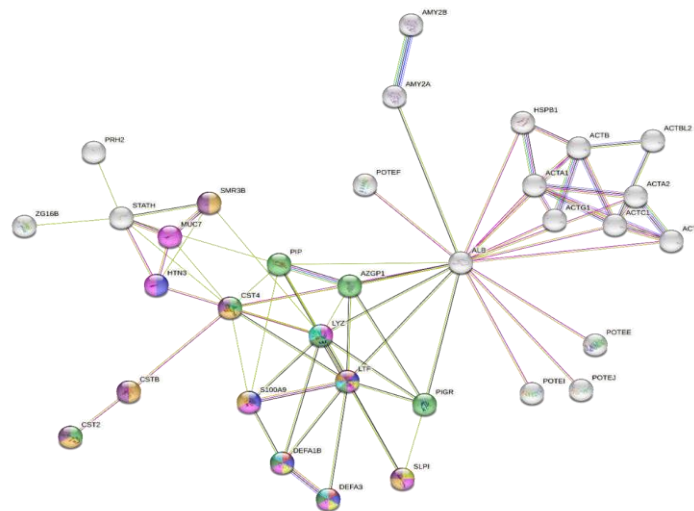
Na comparação Tarde vs. Manhã, o número total de proteínas identificadas foram de 50 e 47, respectivamente, dentre as quais 46 proteínas eram comuns a ambos os grupos. Quatro proteínas foram exclusivas no período da tarde, dentre elas destacamos a proteína Histatin-3, enquanto apenas 1 proteína foi exclusiva no período da manhã (Haptoglobina). Vinte e uma proteínas foram superexpressas na película no período da tarde, tais como 5 isoformas de Alpha amylase, 3 isoformas de cistatinas, Lysozyme C, Submaxillary gland androgen-regulated protein 3B, Neutrophil defensin 1 e 3 (todas com aumento maior que 2 vezes), Statherin, Mucin-7, Albumin e Lactotransferrin. Vinte e uma proteínas também foram subreguladas no período da tarde, destacando 3 isoformas de imunoglobulinas, Protein S100-A9 e A8 e Cystatin-B (Anexo 1 - Tabela S2, em Outros Documentos no SAGE, Figura 8).

A Figura 10 mostra as redes de interação, bem como os Processos Biológicos e Processos da Função Molecular mais afetados seguidos do False Discovery Rate (FDR) entre as proteínas up-regulated e down-regulated identificadas na PAE da comparação entre os grupos Tarde x Manhã (Figura 10)



Por fim, na comparação Noite vs. Tarde, o número total de proteínas identificadas na película adquirida foram de 64 e 54, respectivamente, dentre as quais 50 proteínas eram comuns a ambos os grupos. Quatro proteínas foram exclusivas no período da tarde, enquanto 14 proteínas foram exclusivas no período da noite, dentre elas destacamos 8 isoformas de imunoglobulinas, Proline-rich protein 27, Carbonic anhydrase 6 e Cystatin-C. Trinta e seis proteínas estavam aumentadas na película no período da noite, tais como 5 isoformas de imunoglobulinas, 4 isoformas de Alpha-amylase, 2 isoformas de PRPs, Cystatin-S, Proteín S100-A9, Lysozyme C, Histatin-3, Mucin-7, Albumin e Lactotransferrin. Por outro lado, 9 proteínas foram subreguladas no período da noite, destacando dentre elas, Cystatin-B e -SA, 3 isoformas de imunoglobulinas, Statherin e Neutrophil defensin 1 e -3 (Anexo 1 - Tabela S3, em Outros Documentos no SAGE, Figura 8).

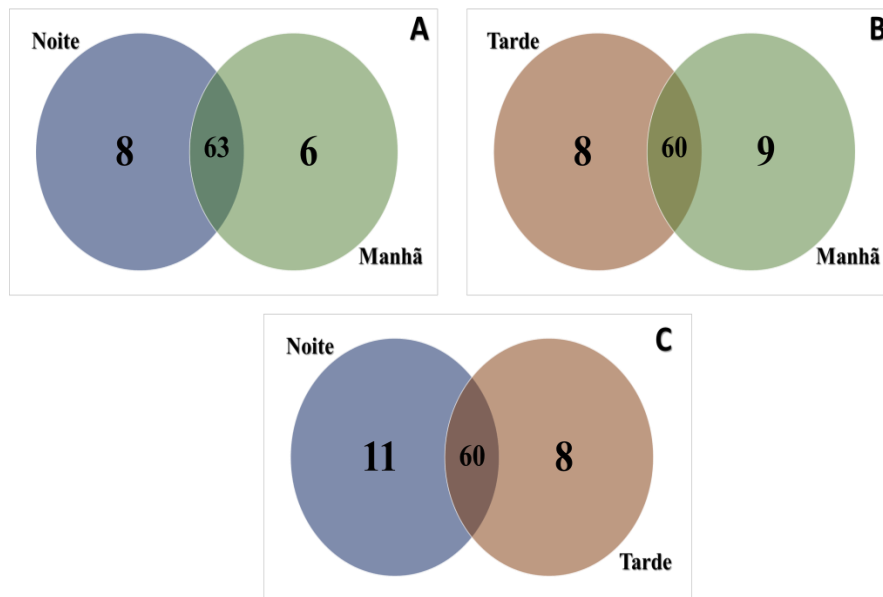
A Figura 11 mostra as redes de interação, bem como os Processos Biológicos e Processos da Função Molecular mais afetados seguidos do False Discovery Rate (FDR) entre as proteínas up-regulated e down-regulated identificadas na PAE da comparação entre os grupos Noite x Tarde (Figura 11).



Já em relação a análise proteômica das amostras de salivas não estimuladas (SNE), a média da quantidade de peptídeos final em cada amostra variou de variou de 135 µg/peptídeos para o

período da manhã, 216 µg/peptídeos para o período da tarde e 88 µg/peptídeos para o período da noite. Figura 12 mostra os diagramas de Venn com os números de proteínas expressas nos três períodos avaliados (manhã, tarde e noite), incluindo proteínas comuns e proteínas exclusivas de cada grupo.

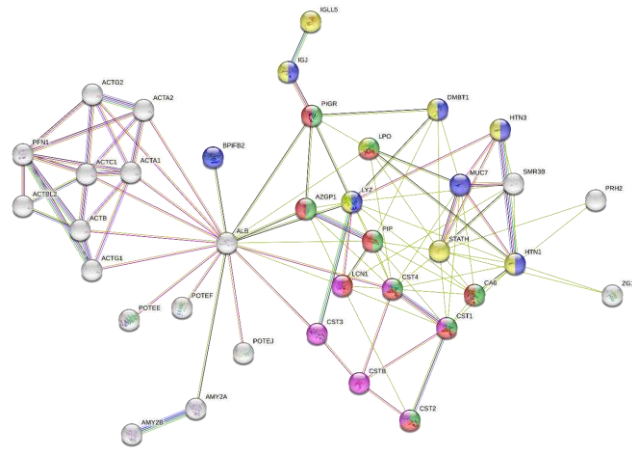
Figura 12. Diagrama de Venn com o número total de proteínas identificadas na saliva nos três períodos distintos: manhã, tarde e noite.



Nas amostras de salivas, na comparação Noite vs. Manhã, os números totais de proteínas identificadas foram de 71 e 69, respectivamente, dentre as quais 63 proteínas eram comuns a ambos os grupos. Oito proteínas foram exclusivas do grupo Noite, dentre elas destacamos a proteína Basic salivary proline-rich protein 2, enquanto 6 proteínas foram exclusivas no período da Manhã, dentre elas estão Cystatin-D Haptoglobin e Proline-rich protein 4. Na expressão diferencial, 50 proteínas estavam aumentadas no período da noite, destacando importantes proteínas típicas da película adquirida como 5 isoformas de alpha amilases (aumentadas mais que 5 vezes), 5 isoformas de cistatinas (Cystatin-S, -SN, -SA, -C, -B), 12 isoformas de imunoglobulinas, Lysozyme C (aumentada mais que 3 vezes), 2 isoformas de PRPs, Mucin-7, Albumin, Histatin-1 e -3 e Statherin. Contudo, apenas duas proteínas foram subreguladas no período da noite em comparação com a manhã, são elas Prolactin-inducible protein e Zymogen granule protein 16 homolog B (Anexo 2 - Tabela S1, em Outros Documentos no SAGE, Figura 12).

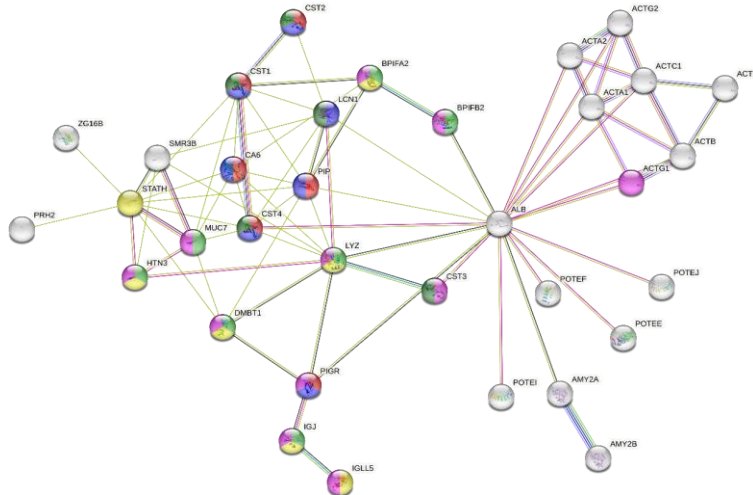
A Figura 13 mostra as redes de interação, bem como os Processos Biológicos e Processos da Função Molecular mais afetados seguidos do False Discovery Rate (FDR) entre as

proteínas up-regulated e down-regulated identificadas nas salivas da comparação entre os grupos Noite x Manhã.



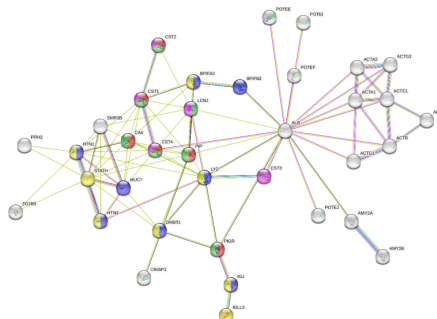
Já na comparação das salivas envolvendo os períodos Tarde vs. Manhã, o número total de proteínas identificadas foram de 68 e 69, respectivamente, dentre as quais 60 proteínas eram comuns a ambos os grupos. Oito proteínas foram exclusivas no período da tarde, dentre elas destacamos 5 isoformas da proteína Hemoglobina (Hemoglobin subunit alpha, beta, delta, épsilon, gamma-1 e gamma-2) e 2 isoformas de imunoglobulinas, enquanto 8 proteínas foram identificadas exclusivamente no período da manhã, dentre elas estão Cystatin-B e -D, Haptoglobin, Neutrophil defensin -1 e -3 e Proline-rich protein. Treze proteínas foram superexpressas na saliva no período da tarde, tais como 2 isoformas de Alpha-amylase, 2 isoformas de imunoglobulinas, Lysozyme C (aumentada mais que 2 vezes), Submaxillary gland androgen-regulated protein 3B (aumentada mais que 3 vezes), **Mucin-7**, **Cystatin-C** e Carbonic anhydrase 6. Por outro lado, 41 proteínas foram subreguladas no período da noite, destacando 13 isoformas de imunoglobulinas, 3 isoformas de Alpha-amylase, Albumin, Cystatin-SA, -SN, -S, Histatin-3 e Statherin (diminuída mais que 3 vezes) (Anexo 2 - Tabela S2, em Outros Documentos no SAGE, Figura 12).

A Figura 14 mostra as redes de interação, bem como os Processos Biológicos e Processos da Função Molecular mais afetados seguidos do False Discovery Rate (FDR) entre as proteínas up-regulated e down-regulated identificadas nas salivas da comparação entre os grupos Tarde x Manhã



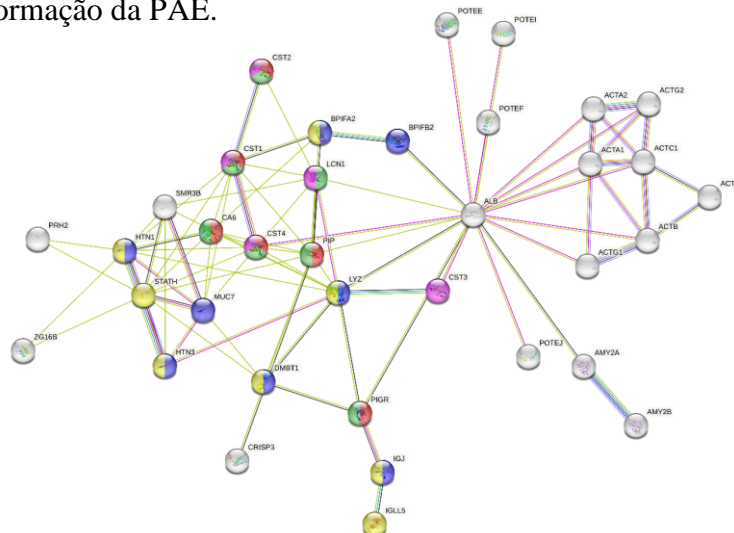
Por fim, na comparação entre as amostras de salivas Noite vs. Tarde, o número total de proteínas identificadas foram de 71 e 68, respectivamente, dentre as quais 60 proteínas eram comuns a ambos os grupos. Onze proteínas foram exclusivas no período da tarde, dentre elas destacamos as proteínas Basic salivary proline-rich protein 2, Cystatin-B e Neutrophil defensin 1 e -3, enquanto 8 proteínas foram exclusivas no período da noite, dentre elas destacamos 6 isoformas de Hemoglobinas (Hemoglobin subunit alpha, beta, delta, épsilon, gamma-1 e gamma 2). Na expressão diferencial, 52 proteínas foram superexpressas nas salivas no período da noite, tais como 15 isoformas de imunoglobulinas, 5 isoformas de Alpha-amylase, Cystatin-SN, -S (com aumento maior que 6 vezes), -SA, -C, Histatin-1 e -3, Statherin (aumentada mais que 3 vezes), Carbonic anhydrase 6 e 2 isoformas de PRPs (Salivary acidic proline-rich phosphoprotein 1/2 e Salivary acidic proline-rich phosphoprotein 1/2). Por outro lado, apenas 2 proteínas foram subreguladas no período da noite, a proteína Mucin-7 e Lysozyme C (Anexo 2 - Tabela S3, em Outros Documentos no SAGE, Figura 12).

A Figura 15 mostra as redes de interação, bem como os Processos Biológicos e pProcessos da Função Molecular mais afetados seguidos do False Discovery Rate (FDR) entre as proteínas up-regulated e down-regulated identificadas nas salivas da comparação entre os grupos Noite x Tarde.



Nove voluntários com boa saúde geral e bucal foram selecionados segundo os critérios de inclusão e exclusão para a participação deste estudo com o intuito de verificar o efeito do ciclo circadiano nas alterações das proteínas salivares e da PAE em diferentes períodos do dia. Assim, foram realizadas todas as formações e coletas de PAE, bem como das SNEs nos três períodos propostos (manhã, tarde e noite), além da avaliação dos fluxos salivares, pH e análise proteômica da PAE e SNE. Sendo assim, no presente relatório final, foram realizadas então toda a análise dos dados proteômicos obtidos das amostras avaliadas nos três períodos propostos (manhã, tarde e noite). Foi realizada toda a tabulação dos dados proteômicos, interpretação das proteínas, análises da expressão diferencial entre os grupos, bem como toda a análise de bioinformática classificando as proteínas e interações. É importante ressaltar que no presente estudo, os nove voluntários passaram por todas as fases do estudo, constituindo os três grupos avaliados que foram divididos nos três períodos de formação e coleta da PAE e SNE, portanto, cada voluntário participou de todos os grupos propostos no presente estudo.

Os períodos de coleta foram divididos porque acreditamos que o ciclo circadiano poderia alterar a composição da PAE, uma vez que esta é formada por grande influência das secreções das glândulas salivares, que são altamente afetadas pelo ciclo circadiano (Dawes 1972). Esta hipótese levantada em nosso projeto de pesquisa foi assim constada a partir dos nossos resultados encontrados, uma vez que houve uma diferença no perfil proteico das películas nos diferentes períodos do dia avaliados. Além disso, estas alterações também foram encontradas nas salivas coletadas nos mesmos períodos que as PAEs. Estas alterações nas suas composições proteicas nos permitem compreender os mecanismos e a influência do ciclo circadiano na formação da PAE.



Em relação aos resultados encontrados, não foram observadas alterações nos fluxos salivares não estimulados nos diferentes períodos do dia, entretanto, uma variação entre a quantidade de peptídeos recuperados na análise proteômica foi observada, onde o período da noite foi o que apresentou uma menor concentração de peptídeos, seguido do período da tarde e manhã. Desta forma, as alterações na composição do perfil proteico de cada período foram avaliadas. Importantes proteínas típicas da saliva e película foram identificadas em nosso estudo, demonstrando assim que a metodologia e condução dos experimentos foi satisfatória. Na expressão diferencial, importantes proteínas relacionadas com atividade antimicrobiana estavam diminuídas na película e salivas no período da noite e tarde quando comparados com a manhã, dentre estas proteínas destacamos as proteínas Protein S100-A8, Neutrophil defensin 1 e 3 e Cystatin-B. Estas proteínas são proteínas comumente encontradas na PAE e possuem importantes funções antimicrobianas, antifúngicas e participam de respostas imunológicas (UNIPROT). A proteína S100-A8 é uma proteína de ligação de cálcio e zinco que desempenha um papel proeminente na regulação de processos inflamatórios e resposta imune, agindo na indução da adesão de neutrófilos (UNIPROT). Além disso, a proteína Cystatin-B é um inibidor intracelular de tiol proteinase com forte ligação das catepsinas B, além de ser considerada ácido-resistente após permanecer na PAE após ataques ácidos com ácido cítrico (Delecrode, Siqueira et al. 2015). Estes achados são interessantes, uma vez que nas redes de interações de ambas as amostras, películas e salivas, diversos processos envolvidos com resposta imune antimicrobiana foram identificados. Ainda nessa linha, na comparação Noite x Tarde das amostras de película, a proteína Cystatin-B está diminuída no período da noite comparado com tarde e nesta mesma comparação com as amostras de saliva, esta proteína foi identificada exclusivamente no período da tarde, mostrando assim que no período da noite a proteção contra ataques erosivos pode estar diminuída. Neste sentido, uma outra proteína merece destaque em nossos achados: a proteína Statherin. Esta proteína é secretada pelas glândulas parótida e submandibular (Oppenheim, Hay et al. 1987, Mutahar, O'Toole et al. 2017), é um componente natural da saliva e está presente nas fases iniciais da formação da PAE (Hannig and Joiner 2006, Vukosavljevic, Custodio et al. 2014). Além disso, a Statherin é considerada uma proteína ácido-resistente após permanecer na PAE após desafios erosivos com ácido clorídrico simulando a erosão intrínseca (Taira, Ventura et al. 2018). Em nosso estudo, a proteína Statherin foi identificada diminuída na PAE no período da noite quando comparado ao período da tarde e diminuída mais que 3 vezes na saliva no período da tarde

quando comparado ao período da manhã. Desta forma, segundo nossos achados no período da noite o ciclo circadiano afeta a proteção ácida da PAE e da saliva, diminuindo assim estas importantes proteínas.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos resultados encontrados neste estudo, foram observadas profundas alterações nas proteínas salivares e nas proteínas da película adquirida do esmalte em comparação aos diferentes períodos do dia (manhã, tarde e noite), especialmente de importantes proteínas relacionadas à proteção antimicrobiana e a resistência ácida da película. Além disso, as proteínas Cystatin-B e Statherin estão diminuídas nos períodos da noite quando comparados ao período da tarde e manhã, demonstrando assim que ao longo do dia a proteção antimicrobiana e resistência ácida da película pode estar diminuída. Estas alterações em relação a proteção do esmalte sob influência do ciclo circadiano devem ser avaliadas em futuros estudos. Por fim, nossos resultados ainda, contribuem com importantes informações para compreendermos as alterações proteicas presente na saliva e películas com a influência do ciclo circadiano, de forma que estes resultados possam ser aplicados futuramente em estudos *in vitro* e *in vivo* que envolvam esta temática

9 REFERÊNCIAS

- number.Carvalho, T. S., T. T. Araujo, T. M. O. Ventura, A. Dionizio, J. V. F. Camara, S. M. Moraes, V. T. Pela, T. Martini, J. C. Leme, A. L. B. Derbotolli, L. T. Grizzo, E. Crusca, P. Y. T. Shiba, R. Marchetto, F. Henrique-Silva, J. P. Pessan and M. A. R. Buzalaf (2020). "Acquired pellicle protein-based engineering protects against erosive demineralization." *J Dent* 102: 103478. number.Cassiano, L. P. S., T. M. S. Ventura, C. M. S. Silva, A. L. Leite, A. C. Magalhaes, J. P. Pessan and M. A. R. Buzalaf (2018). "Protein Profile of the Acquired Enamel Pellicle after Rinsing with Whole Milk, Fat-Free Milk, and Water: An *in vivo* Study." *Caries Res* 52(4): 288- 296. number.Choi, M., C. Y. Chang, T. Clough, D. Broudy, T. Killeen, B. MacLean and O. Vitek (2014). "MSstats: an R package for statistical analysis of quantitative mass spectrometry-based proteomic experiments." *Bioinformatics* 30(17): 2524-2526. number.Dawes, C. (1972). "Circadian rhythms in human salivary flow rate and composition." *J Physiol* 220(3): 529-

545number.Delecrode, T. R., W. L. Siqueira, F. C. Zaidan, M. R. Bellini, E. B. Moffa, M. C. Mussi, Y. Xiao and M. A. Buzalaf (2015).

"Identification of acid-resistant proteins in acquired enamel pellicle." *J Dent* 43(12): 1470-1475. number.Hannig, M. and A. Joiner (2006).

"The structure, function and properties of the acquired pellicle." *Monogr Oral Sci* 19: 29-64. number.Jasim, H., P. Olausson, B. Hedenberg-Magnusson, M. Ernberg and B. Ghafouri (2016).

"The proteomic profile of whole and glandular saliva in healthy pain-free subjects." *Sci Rep* 6: 39073. number.Martini, T., D. Rios, L. P. S. Cassiano, C. M. S. Silva, E. A. Taira, T. M. S. Ventura, H. Pereira, A. C. Magalhaes, T. S. Carvalho, T. Baumann, A. Lussi, R. B. Oliveira, R. G. Palma Dibb and M. A. R. Buzalaf (2019).

"Proteomics of acquired pellicle in gastroesophageal reflux disease patients with or without erosive tooth wear." *J Dent* 81: 64-69. number.Mutahar, M., S. O'Toole, G. Carpenter, D. Bartlett, M. Andiappan and R. Moazzez (2017).

"Reduced statherin in acquired enamel pellicle on eroded teeth compared to healthy teeth in the same subjects: An in-vivo study." *PLoS One* 12(8): e0183660. number.Oppenheim, F. G., D. I. Hay, D. J. Smith, G. D. Offner and R. F. Troxler (1987).

"Molecular basis of salivary proline-rich protein and peptide synthesis: cell-free translations and processing of human and macaque statherin mRNAs and partial amino acid sequence of their signal peptides." *J Dent Res* 66(2): 462-466. number.Pela, V. T., M. A. R. Buzalaf, S. H. Niemeyer, T. Baumann, F. Henrique-Silva, D. Toyama, E. Crusca, R. Marchetto, A. Lussi and T. S. Carvalho (2021).

"Acquired pellicle engineering with proteins/peptides: Mechanism of action on native human enamel surface." *J Dent* 107: 103612. number.Siqueira, W. L., W. Zhang, E. J. Helmerhorst, S. P. Gygi and F. G. Oppenheim (2007).

"Identification of protein components in in vivo human acquired enamel pellicle using LC-ESI MS/MS." *J Proteome Res* 6(6): 2152-2160. number.Taira, E. A., T. M. S. Ventura, L. P. S. Cassiano, C. M. S. Silva, T. Martini, A. L. Leite, D. Rios, A. C. Magalhaes and M. A. R. Buzalaf (2018).

"Changes in the Proteomic Profile of Acquired Enamel Pellicles as a Function of Their Time of Formation and Hydrochloric Acid Exposure." *Caries Res* 52(5): 367-377. number.Ventura, T., L. P. S. Cassiano, E. S. C. M. Souza, E. A. Taira, A. L. Leite, D. Rios and M. A. R. Buzalaf (2017). "The proteomic profile of the acquired enamel pellicle according to its

location in the dental arches." *Arch Oral Biol* 79: 20-29. number.Ventura, T., N. R. Ribeiro, A. S. Dionizio, I. T. Sabino and M. A. R. Buzalaf (2018).

"Standardization of a protocol for shotgun proteomic analysis of saliva." *J Appl Oral Sci* 26: e20170561. number.Ventura, T. M. O., N. R. Ribeiro, E. A. Taira, E. S. C. M. de Souza, C. M. F. Rubira, P. Santos and M. A. R. Buzalaf (2021).

"Radiotherapy changes acquired enamel pellicle proteome in head and neck cancer patients." *J Dent* 108: 103642. number.Ventura, T. M. O., N. R. Ribeiro, E. A. Taira, A. D. Leite, A. Dionizio, C. M. F. Rubira, P. S. D. Santos and M. A. R. Buzalaf (2021).

"Radiotherapy changes the salivary proteome in head and neck cancer patients: evaluation before, during, and after treatment." *Clinical Oral Investigations*. number.Ventura, T. M. O., P. S. S. Santos, N. R. Ribeiro, A. de Lima Leite, E. A. Taira, A. Dionizio, C. M. F. Rubira and M. A. R. Buzalaf (2021).

"Is there difference in the comparative and quantitative salivary proteome between stimulated and unstimulated saliva in head and neck cancer patients treated by radiotherapy?" *Oral Oncol* 118: 105315. number.Vukosavljevic, D., W. Custodio, M. A. Buzalaf, A. T. Hara and W. L. Siqueira (2014).

"Acquired pellicle as a modulator for dental erosion." *Arch Oral Biol* 59(6): 631-638