

POLIANA AMANDA OLIVEIRA SILVA

ANÁLISE PROTEÔMICA DA POLPA DENTÁRIA HUMANA COM DIFERENTES  
CONDIÇÕES CLÍNICAS ENDODÔNTICAS

BRASÍLIA, 2017

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

POLIANA AMANDA OLIVEIRA SILVA

ANÁLISE PROTEÔMICA DA POLPA DENTÁRIA HUMANA COM DIFERENTES  
CONDIÇÕES CLÍNICAS ENDODÔNTICAS

Dissertação apresentada como requisito parcial  
para a obtenção do título de Mestra em Ciências da  
Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em  
Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Orientadora: Profa. Dra. Taia Maria Berto Rezende  
Co-orientador: Prof. Dr. Octávio Luiz Franco

BRASÍLIA  
2017

*Dedico este trabalho a minha família,  
que sempre apoiou minhas escolhas e  
nunca mediram esforços para que  
chegasse aos meus objetivos.  
Obrigada, amo vocês!*

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a **Deus**, que me iluminou durante toda minha caminhada. Foi Ele que me deu força e persistência para continuar mesmo quando tudo parecia não ter solução.

À orientadora **Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Taia Maria Berto Rezende**, pela orientação, apoio e confiança depositada em mim. Por acreditar que tudo daria certo, mesmo diante de todas adversidades.

Ao co-orientador **Prof. Dr. Octávio Luiz Franco**, pela oportunidade e incentivo. Por acreditar em pesquisas e pesquisadores multidisciplinares. E por mostrar ao mundo a grandeza e qualidade de estudos nacionais.

A **Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ana Paula Dias Ribeiro**, por me acolher durante fases difíceis, cedendo seu conhecimento sobre áreas que ainda não entendia, permitindo o desenvolvimento de novas pesquisas.

Aos membros da banca avaliadora, **Prof. Dr. Jacy Ribeiro de Carvalho Junior**, **Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Loise Pedrosa Salles** e **Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Fernanda Cristina Pimentel** pela disponibilidade e contribuição no trabalho realizado.

A amiga de todas as horas **Jessica Moura Pacheco**, por ouvir meus desabafos quando tudo insistia em dar errado e pelas comemorações quando começava a dar certo! Pela ajuda no desenvolvimento dos planos A, B e C que precisei desenvolver durante o mestrado. E pela palavra amiga na hora do desespero.

Aos amigos de laboratório, **Mirna de Souza Freire** que me ensinou tudo que sei sobre proteômica, só tenho que agradecer toda paciência! **Stella Maris de Freitas Lima**, dentista como eu, por entender meu desespero quando chegava chateada por não encontrar um canal, mas principalmente por entender o meu desespero quando não entendia um protocolo de extração de proteínas ou como funcionava algum equipamento do laboratório. A **Ingrid Aquino Amorin** pela companhia nos géis SDS-PAGE da vida e pelas tardes da noite no laboratório. **Ana Paula de Castro Cantuária** por todo auxílio e disposição em sempre ajudar. **Nelson de Oliveira Júnior** e **Flávia Pereira Dutra** por ajuda nos protocolos de proteômica. Ao amigo **Stephan Dohms** por tantas tardes macerando dentes, na tentativa de identificar alguma proteína! Pelas

risadas e músicas compartilhadas. Obrigada a todos que de alguma forma, contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho.

Também agradeço a todos alunos de iniciação científica, responsáveis na agilidade dos experimentos. Especialmente aos alunos **Danilo César Martins** e **Bianca Pinho** por toda ajuda na reta final do desenvolvimento desse projeto.

Ao colega **André Murad**, por permitir uma parceria na identificação de dados no NanoUPLC-MS/MS<sup>E</sup> na Embrapa. Agradeço pelo apoio e auxílio na compreensão dos dados gerados.

A técnica **Kênia Chaves** por todo auxílio na compra de materiais e nas risadas compartilhadas.

A minha família, nunca deixarei de agradecer cada instante de convívio, de amor e de carinho. A minha irmã **Larissa Cristina O. Silva** que distraiu tantas vezes meu cachorro para que pudesse escrever e conseguir entregar tudo a tempo. A minha mãe **Maria Sandra O. Lino** pela sua força, persistência, companheirismo e amor. Ao meu pai, **Rogério Gomes da Silva** por me ensinar a cada dia ser uma pessoa melhor. E não posso deixar de agradecer ao **Jhony**, sim ao meu cachorro, que com seu olhar sabia me compreender e me acalmar. Obrigada por cada instante e apoio. Amo muito vocês.

Ao meu noivo, **Eduardo Alves de Oliveira** por todo carinho, amor e paciência durante esse tempo. Por nunca questionar minhas escolhas e sempre me incentivar.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde** da Universidade de Brasília, pela oportunidade;

Ao **Centro de Análises Proteômicas e Bioquímicas** da Universidade Católica de Brasília, pelo acolhimento e estrutura;

À **CAPES, CNPq, FAPDF**, pelo auxílio financeiro;

Agradeço imensamente a todos!

Todo progresso acontece fora da zona de conforto.  
(Michael John Bobak)

## RESUMO

A Análise proteômica de diferentes condições clínicas da polpa dentária humana pode fornecer informações globais sobre mecanismos de patogenicidade e interações multifatoriais existentes entre microrganismos e o tecido pulpar humano. Assim, o objetivo do estudo foi analisar de forma qualitativa proteínas presentes no tecido pulpar em condições clínicas de polpa normal, pulpite irreversível e necrose com lesão periapical visível radiograficamente. Para isso, três réplicas biológicas, contendo *pool* de 5 dentes, para cada condição clínica foram avaliadas. A extração proteica foi realizada utilizando solução de lise e sonicação, para quantificação foi realizado o método de Bradford. A identificação proteica foi realizada utilizando nanoUPLC-MS/MS<sup>E</sup>, os dados obtidos foram processados e comparados a um banco de dados com auxílio do *software ProteinLynx Global Server (PLGS)*. A partir dessa análise, um total de 508 proteínas foram identificadas. Entre essas, 75 foram avaliadas de forma exclusiva em polpa normal, 59 no diagnóstico de pulpite e 120 em necrose. Observou-se a presença de proteínas comuns aos diferentes diagnósticos clínicos, sendo 72 destas identificadas nos quadros de polpa normal e de pulpite irreversível, 36 nos quadros de pulpite e necrose, 37 nos quadros de polpa normal e necrose e 109 proteínas foram encontradas de forma semelhante em todos os grupos. No quadro de pulpite foram identificadas predominância das proteínas com função relacionada ao metabolismo e vias de energia, apoptose e maior diversidade de proteínas relacionadas a resposta imune em relação ao quadro clínico de polpa normal. No diagnóstico de necrose com lesão periapical foram identificadas predominância de proteínas relacionadas as funções de crescimento celular, metabolismo de proteínas, transporte, resposta imune, assim como proteínas envolvidas na comunicação, sinal de transdução e adesão celular, em relação ao diagnóstico clínico de pulpite irreversível. Desta forma, o presente estudo conclui que uma mudança no perfil de proteínas relacionadas ao processo imune pode ocorrer, conforme ocorre o agravamento da doença. Além disso, a identificação de proteínas de cada diagnóstico clínico pode contribuir para evolução de estudos relacionado ao processo patogênico pulpar e estudos regenerativos.

Palavras chave: endodontia, proteômica, polpa, pulpite e necrose.

## ABSTRACT

The proteomic analysis of different clinical conditions of the human dental pulp can provide global information on mechanisms of pathogenicity and multifactor interactions between microorganisms and human pulp tissue. The objective of this study was to qualitatively analyze the proteins present in pulp tissue under clinical conditions of normal pulp, irreversible pulpitis and necrosis with periapical lesion visible radiographically. For this, three biological replicates of pool containing 5 teeth for each clinical condition was evaluated. Protein extraction was performed using lysis solution (20 mM Tris-HCl pH 8.3, 1.5 mM KCl, 10 mM DTT, 1 mM PMSF 0.1%) and sonication for one minute with alternating cycles. Afterwards, quantification was performed using the Bradford method. The protein identification was performed using nanoUPLC-MS / MSE, the obtained data were processed and compared to a database with the aid of ProteinLynx Global Server (PLGS) software. From this analysis, a total of 508 proteins were identified. Among these, 75 were evaluated exclusively in normal pulp, 59 in the diagnosis of pulpitis and 120 in necrosis. It observed the presence of proteins found similarly between groups, of which 72 were identified between the normal pulp and irreversible pulpitis, 36 in the pulp and necrosis groups, 37 in the normal group and necrosis, and 109 proteins were found in a similar way in All groups. It was observed that from the normal pulp-to-pulpitis table a greater identification of proteins with function related to metabolism and energy pathways, apoptosis and greater diversity of proteins related to immune response was found. From the diagnosis of irreversible pulpitis to periapical lesion necrosis observed an increase in the diversity of proteins involved in cell growth processes, protein metabolism, transport, immune response, as well as proteins involved in communication, transduction signal and cell adhesion. In this way, this work offers complementary and innovative data regarding pulp proteins, since it can lead to advances in the area of tissue regeneration, as well as knowledge of pulp pathogenesis.

Key words: endodontics, proteomics, pulp, pulpitis and necrosis.



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Representação da evolução da patologia pulpar. 1. Progresso de lesão cariosa com rupturas de barreiras de esmalte e dentinárias. 2. Inflamação pulpar, demonstrando a primeira linha de defesa da polpa, com a migração de células da resposta imune inata. 3. Necrose pulpar, processo evolutivo da inflamação pulpar. 4. Lesão periapical, onde células e biomoléculas do sistema imune são atraídas para região. 5. Resposta imuno inflamatória na região periapical com células e produtos relacionados a resposta inata e adaptativa. 6. Reabsorção óssea, iniciada pela ação do RANKL.....32
- Figura 2 – Esquema representativo da metodologia utilizada para identificação de proteínas.....50
- Figura 3 - Relação geral das proteínas identificadas, por nanoUPLC/MS<sup>E</sup>, observadas em todos os grupos e suas interseções, separadas por suas respectivas funções (A) e localização celular (B).....61
- Figura 4 - Diagrama de Venn demonstrando as proteínas identificadas por nanoUPLC/MS<sup>E</sup>, correlacionando-as nos seus respectivos grupos, onde o círculo azul representa as proteínas encontradas em polpa normal, o círculo rosa as proteínas encontradas do diagnóstico de pulpíte irreversível e o círculo amarelo as proteínas identificadas em necrose. As proteínas foram apresentadas conforme sua classificação entre: proteínas exclusivas de cada grupo, proteínas comuns a todos os grupos e proteínas comuns a determinados grupos.....62
- Figura 5 - Relação das proteínas exclusivas identificadas por nanoUPLC/MS<sup>E</sup> separadas por suas respectivas funções, no grupo com diagnóstico de polpa normal (A), pulpíte irreversível (B) e necrose (C).....67

Figura 6 - Relação das proteínas exclusivas identificadas por nanoUPLC/MS<sup>E</sup> separadas por suas respectivas localizações, no grupo com diagnóstico de polpa normal **(A)**, pulpíte irreversível **(B)** e necrose **(C)**.....68

Figura 7 - Representação demonstrando as mudanças funcionais com o avanço da patologia pulpar. Identificações relacionadas ao aumento e diminuição das proteínas identificadas exclusivamente em cada diagnóstico. As setas indicam as funções em aumento e diminuição com avanço da patologia – da normalidade para pulpíte irreversível e da pulpíte irreversível para necrose.....71

Figura 8 - Relação das proteínas comuns entre os grupos. Separadas por suas respectivas funções celular, correspondendo em polpa normal e pulpíte **(A)**, polpa normal e necrose **(B)**, pulpíte irreversível e necrose **(C)**, normal, pulpíte e necrose **(D)**.....76

Figura 9 - Relação das proteínas comuns entre os grupos. Separadas por suas respectivas localizações celular, correspondendo em polpa normal e pulpíte **(A)**, polpa normal e necrose **(B)**, pulpíte irreversível e necrose **(C)**, normal, pulpíte e necrose **(D)**.....77

Figura 10 - Representação de proteínas envolvidas em eventos característicos da polpa normal, pulpíte irreversível e necrose com lesão periapical visível radiograficamente.....95

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Métodos de diagnóstico de alterações pulpareas utilizadas no estudo.....53
- Tabela 2 – Relação de proteínas identificadas exclusivamente no grupo com diagnóstico de polpa normal, separadas pelo código de cada proteína no banco de dados Uniprot, média do *score* no *software ProteinLynx Global Server* (PLGS), média de cobertura, função e localização celular.....116
- Tabela 3 - Relação de proteínas identificadas exclusivamente no grupo com diagnóstico de pulpíte irreversível, separadas pelo código de cada proteína no banco de dados Uniprot, média do *score* no *software ProteinLynx Global Server* (PLGS), média de cobertura, função e localização celular.....120
- Tabela 4 - Relação de proteínas identificadas exclusivamente no grupo com diagnóstico de polpa necrosada, separadas pelo código de cada proteína no banco de dados Uniprot, média do *score* no *software ProteinLynx Global Server* (PLGS), média de cobertura, função e localização celular.....123
- Tabela 5 - Relação de proteínas comuns identificadas nos grupos com diagnóstico de polpa normal e pulpíte irreversível, separadas pelo código de cada proteína no banco de dados Uniprot, média do *score* no *software ProteinLynx Global Server* (PLGS), média de cobertura, função e localização celular.....128
- Tabela 6 - Relação de proteínas comuns identificadas nos grupos com diagnóstico de polpa normal e necrosada, separadas pelo código de cada proteína no banco de dados Uniprot, média do *score* no *software ProteinLynx Global Server* (PLGS), média de cobertura, função e localização celular.....132
- Tabela 7 - Relação de proteínas comuns identificadas nos grupos com diagnóstico de pulpíte irreversível e necrose pulpar, separadas pelo código de cada proteína no

banco de dados Uniprot, média do *score* no *software ProteinLynx Global Server* (PLGS), média de cobertura, função e localização celular.....134

Tabela 8 - Relação de proteínas comuns identificadas nos grupos dos 3 diferentes diagnósticos - polpa normal, pulpíte irreversível e necrose pulpar, separadas pelo código de cada proteína no banco de dados Uniprot, média do *score* no *software ProteinLynx Global Server* (PLGS), média de cobertura, função e localização celular.....136

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAE – Associação americana de endodontia  
ABE – Associação brasileira de endodontia  
ALT - ácido lipoteicóico  
ANX – anexina  
BMP2 - proteína morfogenética 2  
CATK - catepsina K  
Cu – cobre  
CCEO - células escamosas oral  
CDPSCs - células estaminais da polpa dentária cariada  
CLAE - cromatografia líquida de alto desempenho  
CSF-1 - fator estimulador de colônia 1  
CCL – quimiocina pro-inflamatória ligante  
CXCL – quimiocina pro-inflamatória motivo ligante  
DIGE-2D – eletroforese bidimensional em gel  
DMEM - *meio Eagle modificado por Dulbecco*  
DMP1 - fosfoproteína ácida 1 de matriz de dentina  
DPSCs - células estaminais da polpa dentária humana  
DSPP - dentina sialofosfoproteína  
DTT – ditioneitol  
ENO1 - enolase 1  
ESC - células estaminais embrionárias  
FCG - fluido crevicular gengival  
GFP - peptídeo glu-fibrino humano  
GSN – gelsolin  
GTP - guanosina trifosfato  
HCl – ácido clorídrico  
Hsp - proteínas *Heat shock*  
ICAM-1 - molécula de adesão extracelular  
IFN- $\gamma$  - interferon gama  
Ig – imunoglobulinas

IL – interleucina  
IGF-1 - fator de crescimento semelhante a insulina 1  
KCl – cloreto de potássio  
LPS – lipopolissacarídeo  
MALDI - ionização por laser assistida por matriz  
MDSC - células supressoras derivadas de mielóide  
MIP-1 - proteína inflamatória macrófaga 1  
MCP-1 – proteína quimiotática de monócitos 1  
MMPs - metaloproteinase de matriz  
MS - espectrometria de massas  
MSC - células tronco mesenquimais  
NK – células *natural killer*  
NO – óxido nítrico  
PECAM-1 - moléculas de adesão  
PLGS - *ProteinLynx Global Server*  
PMN - células polimorfonucleadas  
PMSF – fenilmetilsulfonil fluorídrico  
RANK – receptor ativador do fator nuclear kappa B  
RANKL – ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B  
SCR – sistema de canais radiculares  
SDS–PAGE - eletroforese em gel de poliacrilamida  
SELDI - ionização por laser de superfície  
SOD - superóxido dismutase  
TCLE - termo de consentimento livre e esclarecido  
TGF- $\beta$  - fator de crescimento transformante beta  
TIMPs - inibidores específicos de tecidos de metaloproteinases  
TLR – receptor semelhante a *tool*  
TNF - fator de necrose tumoral  
TOF - tempo de voo quadrupolo  
TPM4 - tropomiosina alfa 4  
TRAP - fosfatase ácido tartarato resistente  
TRPV - canais vaniloide potenciais de receptor transiente  
Zn – zinco  
2DE - eletroforese bidimensional

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>17</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>19</b>
2.1 FISILOGIA PULPAR .....	19
2.2 CONDIÇÕES PATOLÓGICAS DO TECIDO PULPAR.....	21
2.3 PROTEÔMICA GERAL.....	34
2.4 PROTEÔMICA E ODONTOLOGIA .....	40
2.5 PROTEÔMICA DO COMPLEXO DENTINO-PULPAR E REGIÃO PERIRRADICULAR .....	45
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>50</b>
3.1 OBJETIVO GERAL .....	50
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	50
<b>4. MÉTODOS</b> .....	<b>51</b>
4.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL .....	51
4.2 AMOSTRAS POPULACIONAIS.....	52
<b>4.2.1 Critério de Inclusão</b> .....	<b>52</b>
<b>4.2.2 Critério de Exclusão</b> .....	<b>52</b>
4.3 EXAME CLÍNICO PARA DIAGNÓSTICO .....	53
4.4 OBTENÇÃO DE POLPA DENTÁRIA HUMANA DOS DENTES EXTRAÍDOS.....	54
4.5 DEFINIÇÃO DE GRUPOS E REALIZAÇÃO DE <i>POOL</i> .....	55
4.6 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO PROTEICA .....	55
4.7 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS.....	56
<b>4.7.2 Aquisição NanoUPLC–MS<sup>E</sup></b> .....	<b>57</b>
<b>4.7.3 Processamento de Dados e Identificação Proteica</b> .....	<b>59</b>
<b>4.7.4 Classificação e organização de proteínas</b> .....	<b>60</b>
4.8 ASPECTOS ÉTICOS .....	60
<b>5 RESULTADOS</b> .....	<b>61</b>
5.1 PROTEÍNAS EXCLUSIVAS A CADA DIAGNÓSTICO CLÍNICO .....	64
<b>5.1.1 Proteínas identificadas exclusivamente em polpa normal</b> .....	<b>64</b>
<b>5.1.2 Proteínas identificadas exclusivamente no quadro clínico de pulpite         irreversível</b> .....	<b>66</b>

5.1.3 Proteínas identificadas exclusivamente no quadro clínico de necrose pulpar .....	67
5.1.4 Comparação do panorama de proteínas exclusivas identificadas entre os grupos de polpa normal, pulpíte irreversível e necrose .....	70
5.2 PROTEÍNAS COMUNS A MAIS DE UM DIAGNÓSTICO CLÍNICO .....	73
5.2.1 Proteínas comuns entre polpa normal e pulpíte irreversível identificadas .....	73
5.2.2 Proteínas comuns entre polpa normal e necrose pulpar identificadas .....	74
5.2.3 Proteínas comuns entre pulpíte irreversível e necrose pulpar identificadas .....	75
5.2.4 Proteínas comuns entre polpa normal, pulpíte irreversível e necrose pulpar identificadas .....	76
6 DISCUSSÃO .....	79
7 CONCLUSÕES .....	96
8 REFERÊNCIAS .....	97
9 ANEXOS .....	109
9.1 PARECER DE APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA .....	109
9.2 ANEXO B – TABELAS DE IDENTIFICAÇÕES PROTEICA .....	115
9.3 ANEXO C – PUBLICAÇÕES DURANTE O MESTRADO .....	139
9.3.1 Publicação de artigo para revista <i>Brazilian Journal of Periodontology</i> .....	139
9.3.2 Submissão de artigo para revista <i>Clinical Oral Investigation</i> .....	140



## 1.INTRODUÇÃO

O tecido pulpar pode ser exposto a várias agressões (1). Sendo que, as principais alterações patológicas que acometem a polpa e os tecidos perirradiculares podem ser de natureza inflamatória e de etiologia infecciosa (2). A intensidade da resposta inflamatória pode variar de acordo com o tipo e intensidade da agressão sofrida (3). Nos casos em que o processo desencadeante da resposta inflamatória não é removido, um processo de pulpíte irreversível pode ser instalado (4, 5). Nessa patologia, uma maior predominância de células representativas da resposta imune adaptativa é visualizada. Essa pode ser caracterizada por uma resposta humoral ou celular, sendo que a primeira é mediada por anticorpos. E a resposta imune celular pode ser mediada por células T CD8<sup>+</sup> que eliminam diretamente a célula infectada (2). Antígenos apresentados às células T CD4<sup>+</sup>, podem se diferenciar em CD4<sup>+</sup>Th1, que ativam células mononucleares (macrófagos e linfócitos), CD4<sup>+</sup>Th2, que induzem a proliferação e diferenciação das células B em plasmócitos produtores de anticorpos (6) e CD4<sup>+</sup>Th17, envolvidas na proliferação de citocinas pro inflamatórias. Com o aumento dos microrganismos no interior da cavidade pulpar e resposta imune demasiada, danos ao tecido pulpar podem ocorrer, ocasionando um processo de necrose tecidual (1, 7). A contínua colonização microbiana pode atingir a região periapical, com isso respostas de defesa do hospedeiro, culminam no desenvolvimento de lesões periapicais (8). Neste processo, os osteoclastos são ativados pela estimulação do receptor ativador do fator nuclear kappa B (RANK) (9). A ativação destas células, leva a liberação de enzimas líticas no vacúolo de reabsorção, promovendo a degradação óssea, com o estabelecimento da reabsorção óssea perirradicular (10).

Todo processo de evolução patológica pulpar pode ser melhor compreendido com as ferramentas proteômicas (11, 12). Essa tecnologia pode auxiliar a odontologia na identificação de biomarcadores envolvidos no processo patológico da doença pulpar, permitindo avanços no estudo do diagnóstico e tratamento de doenças relacionadas ao tecido pulpar (13). Além disso, a identificação de proteínas do tecido pulpar pode contribuir para o avanço de estudos relacionados a regeneração tecidual (14). No entanto, embora estudos proteômicos tenham se destacado nos últimos

anos, esta técnica tem sido pouco explorada na endodontia, principalmente no estudo de condições clínicas de inflamação e necrose do tecido pulpar (12). Dentre as técnicas mais recentes, a cromatografia líquida em nano escala acoplada a um espectrômetro de massa *electrospray*, nanoUPLC/MS<sup>E</sup>, tem ganhado espaço na proteômica para identificação de proteínas em nano escala (11, 12), correspondendo uma importante tecnologia para identificação de proteínas em pequenas quantidades de tecido, assim como observado em polpa dentária humana (15).

Desta forma, em função da carência de estudos proteômicos relacionados a evolução clínica de patologias do complexo pulpo-perirradicular. E devido a importância da caracterização das proteínas no conhecimento da fisiologia do complexo dentino-pulpar, este trabalho objetiva identificar as proteínas relacionadas aos eventos patológicos em quadros de pulpite irreversível e necrose pulpar, comparando com diagnósticos de polpas normais. Assim, oferecendo dados para possíveis pesquisas na área de regeneração tecidual e avanços na compreensão da patogênese pulpar.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 FISILOGIA PULPAR

O tecido pulpar corresponde ao único tecido dentário não mineralizado. Este pode ser caracterizado pela presença de um tecido conjuntivo frouxo ricamente vascularizado e inervado, apresentando uma íntima relação com o tecido dentinário (17). Os principais componentes celulares da polpa podem ser localizados periféricamente, sendo caracterizado pelos odontoblastos e fibroblastos do estroma (18). Células mesenquimais indiferenciadas também podem ser encontradas, principalmente no nicho paravascular, além de células relacionadas a resposta imune (19). Em uma polpa saudável, os neutrófilos predominam, no entanto, também podem ser encontradas células dendríticas e macrófagos ocasionais (20).

Os fibroblastos possivelmente podem ser as células mais numerosas e provavelmente estão envolvidos no processo de formação das fibras colágenas (18, 20). Moule et al. (18) sugerem que essas células podem ter uma divisão limitada, embora a renovação celular continue após apoptose (18). Em adição, tem sido relatado que superficialmente, todos os fibroblastos parecem morfológicamente semelhantes, porém variações na sua atividade proliferativa sugerem que representam uma população celular heterogênea (18).

Os odontoblastos consistem em células pós-mitóticas de longa duração que se alinham ao longo da interface dentina-polpa. Neste local mantêm a aposição pré-dentina e dentina, durante toda a vida de um dente (16). Assim, odontoblastos estendem seu processo citoplasmático nos túbulos dentinários e possuem a função de dentinogênese (17). Smith et al. (21) citam importantes fatores de crescimento para diferenciação de odontoblastos durante a formação da dentina primária, dentre estes, o fator de crescimento transformante beta (TGF- $\beta$ ) (21). Além desse fator de crescimento, Begue-Kirn et al. (22) também relatam a importância dos TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 3, proteína morfogenética 2 (BMP2) e fator de crescimento semelhante a insulina 1 (IGF-1) na diferenciação de odontoblastos *in vitro*. Os odontoblastos tipicamente

sintetizam proteínas denominadas de dentina sialofosfoproteína (DSPP) e fosfoproteína ácida 1 de matriz de dentina (DMP1), proteínas consideradas como marcadores de odontoblastos, embora também sejam sintetizadas em pequenas quantidades por osteoblastos (22). Mutações nessas proteínas podem gerar anomalias estruturais dentárias (16).

As células de defesa também podem ser encontradas na polpa saudável, na qual parecem ser observadas principalmente células dendríticas e macrófagos (23). Essas células encontram-se principalmente na periferia pulpar, onde podem participar na vigilância desse tecido e contribuem para resposta inata frente a cárie dentária (24). Os linfócitos, no entanto, parecem ser raramente encontrados (23).

O tecido pulpar apresenta quatro funções principais, correspondendo a função formadora, nutritiva, defensiva e sensorial. A função formadora está relacionada a formação da dentina que a circunda (25). Nutritiva porque a vascularização pulpar fornece oxigênio e nutrientes para formação dentinária (17). Também atua como um tecido defensivo, uma vez que apresenta capacidade de ativar o sistema imune a reagir contra agressões formando dentina esclerosada e/ou terciária (2, 25). Além de possuir a função sensorial, que desempenha pelas terminações nervosas livres, resposta dolorosa aos agentes agressores (26, 27).

A polpa apresenta inervação sensorial e autônoma. A inervação sensorial pode ser originada através do nervo trigêmeo e se encerra através das terminações livres da polpa (28). O tecido pulpar pode ser representado por três tipos de fibras nervosas: A- $\beta$ , A- $\delta$  e C. As fibras A- $\beta$  manifestam-se como mielinizadas com rápida velocidade de condução e acredita-se que possui a função de nocicepção (27). As fibras A- $\delta$  também podem ser mielinizadas, possuem alta velocidade de condução e baixo limiar de excitabilidade, atuam na dor aguda e transitória, característica de sensibilidade dentinária, estão dispostas na camada odontoblástica e no limite polpa-dentina. As fibras do tipo C consistem em fibras amielínicas com velocidade de condução lenta e com alto limiar de excitabilidade, caracteriza por expressar uma dor lenta, excruciante e por vezes, difusa (26, 27). As fibras nervosas simpáticas do sistema nervoso autônomo parecem ser originadas do gânglio cervical superior e estão relacionadas com a modulação neurogênica da microcirculação e podem possuir um papel na dentinogênese (3, 26). Goldeberg e Smith (17) inferem que o número de fibras nervosas não parece ser estável no dente, talvez refletindo o ambiente em mudança

ao qual estas podem ser submetidas (17). Estudos demonstram que aumentos significativos da inervação e liberação de neuropeptídeos pulpar ocorre após danos teciduais (29, 30). Tal fato implica na capacidade de regeneração neural da polpa dentária e oferece possibilidades no campo de regeneração pulpar (17).

A inervação pulpar geralmente pode acompanhar a direção dos vasos sanguíneos, acessando a cavidade pulpar via forame apical ou foraminas, se estendendo e ramificando-se, no sentido coronário (26). A vascularização pulpar pode ser representada por vasos centrais que se ramificam para um plexo em direção à periferia, especificamente na direção dos cornos pulpares (20). Goldeberg e Smith (17) citam que as camadas odontoblásticas parecem ser vascularizadas certamente por capilares que formam estruturas pequenas e glomerulares bem individualizadas, as quais alimentam áreas com cerca de 100 a 150  $\mu\text{m}$  de largura (17). Na porção radicular artérias e veias encontram-se localizadas centralizadamente, com rede de capilares subodontoblásticas (17). Em decorrência, da polpa não possuir um verdadeiro suprimento sanguíneo colateral, esta se torna mais suscetível aos efeitos deletérios de uma inflamação grave (3). Em condições de exposição dentinária, um aumento na pressão pulpar pode ser observado, provocando um fluxo de fluido dentinário em direção externa. Na presença de microrganismos, esse mecanismo ajuda a diluir os produtos bacterianos e oferece resistência à invasão bacteriana (2).

## 2.2 CONDIÇÕES PATOLÓGICAS DO TECIDO PULPAR

Diferentes alterações teciduais pulpares podem ser observadas na presença de diferentes estímulos (20). Diferentes agressões podem acometer o tecido pulpar, sendo estes físicos, químicos e biológicos. Dependendo da intensidade e duração da agressão aplicada, o tecido pulpar responderá de modo reversível ou irreversível (3). A agressão mais frequente corresponde a biológica, representada por microrganismos provenientes da cárie dentária (20). A via de entrada mais comum para os microrganismos certamente corresponde a cárie dentária. Outras vias potenciais para infecção microbiana pulpar incluem trauma, trincas ou fraturas dentinárias, túbulos

dentinários expostos ou através do forame apical. As células da polpa dentária humana que expressam receptores semelhantes a *Toll* (TLR) contribuem para iniciar respostas imunes a microrganismos e seus subprodutos (25). Este grupo inclui odontoblastos (16), células endoteliais, bem como macrófagos e células dendríticas (20). Algumas destas células podem formar barreiras mecânicas (odontoblastos), detectar e transmitir sensações (fibras nervosas) ou diferenciam-se para limitar infecção, acionar um sinal de lesão e promover o reparo (2).

Em resposta a um estímulo local, o processo de dentinogênese terciária reacional pode ser iniciada, ocasionando a formação de dentina por odontoblastos pré-existentes (2). Neste processo, dentina pode ser formada com semelhanças anatômicas, bioquímicas e funcionais com a dentina primária e secundária, na intenção de proteger o tecido pulpar contra agentes irritantes (16). Com o aumento da intensidade da agressão, a morte odontoblástica pode ocorrer, com isso ocorre a liberação dos fatores de crescimento TGF- $\beta$ 1 e TGF- $\beta$ 3 por odontoblastos, o que podem induzir a diferenciação de células mesenquimais indiferenciadas em odontoblastos-*like* e assim, ocasionar uma sintetização de matriz dentinária e sua posterior mineralização, ocorrendo a formação de dentina reparadora (21, 31). Além de células mesenquimais indiferenciadas, estudos investigam a capacidade dos fatores de crescimento induzirem a diferenciação de células subodontoblásticas, fibroblastos e pericitos derivados de paredes vasculares, em células semelhantes a odontoblastos (32).

Como mudança dos tecidos pulpares em decorrência a agressões leves, repetidas vezes por um longo período de tempo, observa-se as calcificações pulpares. Os fatores para formação de calcificações ainda não estão totalmente esclarecidos, mas podem estar relacionados com áreas de tecidos danificados e na deposição de cristais de fosfato de cálcio em células mineralizantes. Beres et al. (31) concluíram que condições de estresse oxidativo devido a estímulos agressivos e níveis elevados de cobre (Cu) e zinco (Zn) na polpa podem ocorrer calcificações (31).

Com o avanço dos microrganismos nos túbulos dentinários, os odontoblastos podem desempenhar um papel de sinalizador na imunidade inata (2) (Figura 1) (33), pois essas células expressam vários receptores de reconhecimento de patógenos especializados, entre eles o mais estudado parecem ser os receptores semelhantes a *Toll* 2 (TLR)2 . Este receptor pode ser responsável pelo reconhecimento do ácido

lipoteicóico (ALT), componente da parede celular de bactérias Gram-positivas (2, 16, 34). Com o reconhecimento de patógenos, o receptor TLR2 induz a produção de beta-defensinas, caracterizadas por peptídeos antimicrobianos que lisam bactérias a partir da formação de poros em sua membrana celular (25). Além das betas-defensinas, outra molécula produzida para enfrentamento inicial de bactérias pode ser representada pelo óxido nítrico (NO), principalmente na isoforma NOS2, que pode ser produzido como agente antimicrobiano (2). Após o reconhecimento de patógenos por TLR2 ocorre a síntese de várias quimiocinas pró-inflamatórias, como CCL2, CXCL2, CXCL8 e CXCL10, responsáveis na quimiotaxia de células dendríticas imaturas, levando ao acúmulo dessas células na região paraodontoblástica, em uma camada abaixo da dentina cariada (16). Desta forma, os odontoblastos podem estar envolvidos na resposta imune primária, no combate às invasões e ativação dos aspectos inatos e adaptativos da imunidade pulpar (5).

Além dos componentes dos odontoblastos se tornarem importante para resposta imune inata pulpar, a presença de componentes do fluido dentinário, também parecem iniciar uma resposta imune inata. Tal fato ocorre em função da composição do fluido dentinário apresentar proteínas séricas e imunoglobulinas (5). Hahn (35) relata que imunoglobulina G (IgG) juntamente com proteínas derivadas do soro, tais como albumina e fibrinogênio podem aderir aos túbulos dentinários e diminuir inespecificamente a difusão interna de antígenos (35). O fluido dentinário também pode ser composto por proteínas do sistema complemento, porém nota-se sua ineficiência contra bactérias Gram-positivas. No entanto, subprodutos como C3a e C5a podem participar da resposta inicial recrutando e ativando leucócitos (5).

Com a evolução da doença pulpar, células efetoras inatas (neutrófilos, monócitos, macrófagos, linfócitos e células NK) infiltram-se progressivamente na polpa (23). A presença de macrófagos podem ser encontrada em maior número, pois possuem a eficiência em eliminar agentes patogênicos em ambas as respostas imunes inatas e adaptativas (36). Além de constituir importante papel na homeostase dos tecidos, através da depuração de células senescentes e na remodelação e reparação de tecidos (5). Por conseguinte, macrófagos derivados de monócitos podem ser ativados no estado inicial da pulpíte para proteger a polpa dentária, aumentando a capacidade de permeabilidade vascular e a função de remover antígenos estranhos e tecidos danificados da polpa inflamada (Figura 1) (2, 33).

Com o estabelecimento e a caracterização do biofilme microbiano, espécies bacterianas distintas iniciam a colonização da superfície dentária, com a presença de bactérias Gram positivas e negativas (37). Estas possuem em sua parede, o lipopolissacarídeo (LPS) que representa um dos mais potentes ativadores do sistema imune inato (34). Observa-se que em resposta a presença do LPS, numerosas citocinas podem ser induzidas, devido as ligações agonistas nos TLR4 (37). Com a ativação de TLR4 ocorre a indução de genes inflamatórios, tais como fator de necrose tumoral (TNF), interleucina (IL)-6 e IL-1 $\alpha$ , além da molécula antiinflamatória IL-10 (37). Renard et al. (19) demonstram que o LPS aumenta e regula a inflamação em modelo de pulpíte reversível de incisivos de roedores. Nesse estudo, também pode ser relatada uma população celular enriquecida com células supressoras derivadas de mielóide (MDSC) que poderia desempenhar um papel crucial na resolução da resposta inflamatória inata e permitir processos reparativos (19).

Como manifestação sintomatológica de uma agressão pulpar, como exemplo em lesões de cárie, a dor pode estar presente (27-29). A teoria mais aceita para as respostas dolorosas dentárias certamente corresponde a teoria hidrodinâmica, na qual estímulos externos atuam sobre a dentina, induzindo o movimento rápido do fluido dentinário no interior dos túbulos, promovendo a dor (27). O mesmo sintoma pode ser observado após estimulação térmica, mecânica, osmótica e evaporativa do tecido pulpar (28). Porém, estudos recentes demonstram a possibilidade de odontoblastos funcionarem como células sensoriais para detectar e levar a estímulos fisiológicos, tais como estímulos térmicos, mecânicos e químicos, através de canais iônicos presentes na membrana celular (38, 39). Sato et al. (38) demonstraram que mecanismos hidrodinâmicos ocasionam distúrbios nos processos odontoblásticos dos túbulos dentinários e ativam os canais vaniloide potenciais de receptor transiente (TRPV), gerando a detecção de estímulos aplicados à dentina exposta e condução de funções celulares, como a estimulação e transdução sensorial (38).

Características citadas da resposta imune inata podem ser percebidas em diagnósticos clínicos pulpares de pulpíte reversível, nomenclatura recomendada pela Associação Americana de Endodontia e Associação Brasileira de Endodontia (AAE/ABE), porém alguns autores também designam como hiperemia pulpar ou pulpalgia hiper-reativa (1, 7). Nessa condição, após a eliminação dos tecidos mineralizados deteriorados contendo agentes microbianos, o tecido ainda está em



condição de se recuperar, ocorrendo uma diminuição da inflamação, cicatrização dos tecidos e restauração das funções biológicas normais da polpa (2, 27). Quando não ocorre a remoção do agente desencadeante da agressão, acontece a transição da resposta imune inata para uma resposta imune adaptativa (6). Estudo relata que essa transição pode ocorrer quando a polpa se encontra com menos de 2mm da lesão de cárie, passando a um diagnóstico de pulpíte irreversível (23).

A pulpíte irreversível pode ser delineada a partir da resposta imunológica adaptativa, que possui características de especificidade, diversidade, memória, especialização, autolimitação e tolerância. Dois tipos de resposta imune adaptativa podem ser reconhecidas, a resposta imune humoral e a celular (Figura 1) (33, 40). A resposta imune humoral corresponde a resposta mediada por anticorpos produzidos por linfócitos B, esses certamente são anticorpos especializados e podem ativar diferentes mecanismos para combater os microrganismos (6, 35). Essa imunidade parece ser o principal mecanismo de defesa contra microrganismos extracelulares e suas toxinas. Já a resposta imune celular parecem ser mediadas por linfócito T, possui a função de promover a destruição dos microrganismos residentes nos fagócitos, ou na lise de células infectadas (6).

A imunidade mediada por células se desenvolve por uma rede de interações, onde os antígenos de patógenos processados no citoplasma, fora de vesículas ácidas, são possivelmente conduzidos e apresentados para as células T CD8<sup>+</sup> que eliminam diretamente a célula infectada (2). Já os antígenos de patógenos processados em vesículas ácidas, parecem ser apresentados pelas moléculas de classe II às células T CD4<sup>+</sup>, que podem se diferenciar em dois tipos: CD4<sup>+</sup>Th1, que ativam células mononucleares (macrófagos e linfócitos), CD4<sup>+</sup>Th2, que induzem a proliferação e diferenciação das células B em plasmócitos produtores de anticorpos (6) e CD4<sup>+</sup>Th17, envolvidas na proliferação de citocinas pro inflamatórias (41).

Com a apresentação dos antígenos pelas células dendríticas, os linfócitos podem ser ativados (2). Os linfócitos T CD4<sup>+</sup> ativados se diferenciam em células efetoras que produzem quimiocinas inflamatórias, essas juntamente com a regulação positiva de moléculas de adesão, irão determinar a composição do infiltrado inflamatório. Moléculas de adesão (PECAM-1) e molécula de adesão extracelular (ICAM-1) podem ser secretadas em células endoteliais para facilitar o extravasamento de leucócitos (35). Na polpa acometida pelo quadro de pulpíte irreversível, a proteína

quimiotática de monócitos (CCL20/IMP3 $\alpha$ ), pode explicar o recrutamento de células T de memória, particularmente células Th2 e células dendríticas para compor o processo inflamatório (6).

Os fagócitos que podem ser derivados da resposta imune inata também podem desempenhar papel importante na resposta imune adaptativa, através da apresentação de antígenos por essas células aos linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>, levando a secreção de citocinas (5). Os macrófagos podem ser de extrema importância na resposta inflamatória, pois além da função de apresentação de antígeno e fagocitose, também possuem a capacidade de imunomodulação, devido a produção de citocinas e fatores de crescimento (6, 8). Eles parecem ser ativados por linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> ou através de interferon gama (IFN- $\gamma$ ), a partir da interação de CD40L-CD40 (36). Após ativados, os macrófagos produzem TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-12, IL-10, quimiocinas e fatores lipídios de curta duração, como fator de ativação de plaquetas, prostaglandinas e leucotrienos para integrar a inflamação (6).

Com a apresentação de antígenos para linfócitos T CD4<sup>+</sup> parece ocorrer a liberação de citocinas derivadas de linfócitos Th1, Th2, Th17 e células T reguladoras (Tregs). As citocinas derivadas de Th1, também chamadas de citocinas tipo 1, correspondem a IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-12 e TNF- $\alpha$ , essas orquestram uma resposta imune exacerbada e inibem a atividade de citocinas derivadas de Th2 (citocinas do tipo 2) (6). As citocinas Th2 podem ser representadas por IL-10 e IL-4, que possuem a função de suprimir a atividade de macrófagos e estimular células B a se proliferar e diferenciar-se, gerando então uma homeostase e cronificação da doença (34). As derivações das células Th17 correspondem as citocinas do tipo IL-17, IL-21 e IL-22, envolvidas na indução da expressão de citocinas pró inflamatórias. Embora produzida principalmente pelas células T, a IL-17 ativa muitos dos eventos sinalizados por citocinas da resposta imune inata, tais como: TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , sendo considerada uma molécula de ligação entre essa resposta e a resposta imune adaptativa (41, 42). Estudos relacionados a inflamação pulpar demonstram que tanto citocinas do tipo 1, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , quanto citocinas do tipo 2, IL-10 e IL-4 estão aumentadas em quadros de pulpíte irreversível (6, 43). Farges et al. (25) demonstraram que a IL-10 parece não ser expressa em polpa humana saudável mas pode estar fortemente aumentada nos quadros de pulpíte irreversível (25). Em adição, Renard et al. (19) após induzir uma resposta inflamatória compatível com pulpíte, utilizando LPS de *Escherichia coli* em

incisivos de ratos, demonstraram que os transcritos de IL-10 também podem estar aumentados após tratamento com LPS em comparação com PBS (19). Em estudo realizado em camundongos, He et al. (44) sugerem que as respostas Th1 e Th2 estejam ativas no desenvolvimento da inflamação pulpar e que a resposta Th1 desempenha um papel de liderança 6 horas (h) após a exposição pulpar (44). A citocina TNF- $\alpha$  pode causar dilatação e aumento da permeabilidade dos vasos sanguíneos causando extravasamento de leucócitos dos vasos sanguíneos para área agredida (6). Pezelj et al. (43) observou que a produção de TNF- $\alpha$  pode ser maior em quadros de pulpíte irreversível sintomática e à medida que a inflamação progride a produção desta citocina diminui, ainda sendo encontrada em pulpíte irreversível assintomática e diminuindo a produção drasticamente em quadros de necrose (43).

Clinicamente os eventos relacionados a resposta imune adaptativa, caracterizada na pulpíte irreversível corresponde a uma dor intermitente ou contínua, de modo que pacientes relatam que a dor aumenta em situações de repouso, em decúbito (1). Neste momento, quando o estímulo agressor não é removido, os fenômenos vaso-exsudativos apresentam seu início. Os estímulos gerados ocasionarão um aumento do fluxo e permeabilidade dos vasos sanguíneos da polpa, podendo causar um aumento transitório da pressão do tecido intersticial. Quadro que em situações de normalidade pode ser drenado pelo sistema circulatório ou linfático, porém em caso de lesões teciduais, não há como retornar a pressão normal da polpa (5, 45). Uma vez que a polpa está circundada por paredes dentinárias rígidas, nos momentos de inflamação pulpar e, conseqüentemente, aumento de volume desse tecido, há a compressão das fibras nervosas, gerando dor (46). Porém, a inflamação pulpar parece não ser a única envolvida na sensação de dor, produtos derivados de bactérias ou do hospedeiro podem modular a intensidade da dor, como metabólitos bacterianos de lesões cariosas, modificadores derivados do hospedeiro como endógenos opióides (provavelmente liberados por linfócitos) (47), sistema adrenérgicos simpáticos e óxido nítrico (6).

Os quadros de pulpíte irreversível assintomática podem ser caracterizados pela presença de uma inflamação crônica no tecido pulpar e está associado à presença de uma câmara pulpar aberta, o que gera uma via de drenagem e, portanto, pode resultar na ausência de sintomas (1). Pesquisas também demonstram que essa ausência de sintomas pode ser representada por uma proteína denominada somatostatina que

possui ação analgésica forte e a produção de endógenos opióides também podem ser relatados em maior quantidade na polpa inflamada, podendo ocasionar na diminuição da sensibilidade a dor nesse diagnóstico (47).

Com o aumento da invasão de bactérias ao espaço pulpar, a capacidade de recuperação do tecido pulpar fica impossibilitada, ocasionando desse modo a necrose do tecido. He et al. (44) em estudo com camundongos observam que a expressão de citocinas inflamatórias foi maior nos períodos de 6 a 12 h. Sendo após 72 h de exposição pulpar, a necrose observada em todo tecido pulpar (44). No diagnóstico clínico de necrose pulpar, todo o conteúdo pulpar e paredes dentinárias adjacentes podem possuir agregação microbiana/biofilme aderidas (48). Em estudo histológico Ricucci e Siqueira (48) observaram na necrose pulpar um grande acometimento de biofilme, na câmara e canais pulpares, com espessuras variáveis. Biofilme em dentina terciária e nódulos pulpares também foram avaliados, porém na região apical, ainda foi possível encontrar a presença de tecido inflamado (48). Experimentos em modelos animais relataram que a periodontite apical pode se desenvolver mesmo antes do tecido pulpar se tornar completamente necrótico (49).

O canal radicular necrótico representa um nicho ecológico rigoroso para o crescimento microbiano, devido à diminuição de oxigênio e à disponibilidade de tecidos hospedeiros e fluidos teciduais como fonte primária de nutrientes (50). Estudos microbiológicos de canais radiculares cronicamente infectados concordam, em geral, que a população microbiana parece ser caracterizada em sua maior parte por microrganismos anaeróbios e Gram-negativos, principalmente nas regiões apicais. Diferentes espécies bacterianas pertencentes aos gêneros *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Fusobacterium*, *Treponema*, *Campylobacter*, *Enterococcus* e *Tannerella* possivelmente encontradas na infecção endodôntica primária (51, 52). Esses microrganismos presentes na necrose pulpar podem produzir alta gama de metabólitos, tais como compostos de enxofre, incluindo o metilmercaptano e o hidrogênio sulfuro, bem como os derivados tioéter, tais como o sulfureto de dimetilo e o sulfato de dietilo, que parecem ser produtos metabólicos gerados principalmente por bactérias anaeróbias através da dessulfuração de cisteína, glutatona, L-metionina e peptídeos contendo L-metionilo. Esses compostos de enxofre estimulam as células imunes e induzem a cascata inflamatória (53).

A invasão inicial dos microrganismos na região periapical pode gerar uma resposta intensa de curta duração, esse processo pode ser acompanhado por sintomas clínicos como dor, elevação dos dentes e sensibilidade à pressão. Essas lesões iniciais são denominadas de periodontite apical sintomática (54). Nestas, a resposta ainda parece ser limitada ao ligamento periodontal apical, que pode ser iniciado pela resposta neurovascular típica da inflamação, resultando em hiperemia, congestão vascular, edema do ligamento periodontal e extravasamento de neutrófilos (1). Estes últimos parecem ser atraídos para a área por quimiotaxia, induzida inicialmente por lesão tecidual, produtos bacterianos (LPS) e fator complemento C3a e C5a (8). Uma vez que a integridade do osso, cemento e dentina ainda não foi perturbada, as alterações periapicais nesta fase parecem ser radiograficamente indetectáveis (8).

A interação de células polimorfonucleadas (PMN) com microrganismos pode ser de particular importância na progressão da periodontite, pois embora as PMN sejam essencialmente células protetoras, elas podem causar danos graves aos tecidos do hospedeiro (55). Seus grânulos citoplasmáticos contêm várias enzimas que, durante a liberação, degradam os elementos estruturais de células de tecidos e matrizes extracelulares. Por serem células de curta duração, os PMN morrem em grande número em locais inflamatórios agudos, gerando portanto, o acúmulo e a morte maciça de neutrófilos (51, 55). Assim, origina uma das principais causas de destruição de tecido em fases agudas de periodontite apical sintomática, se essa resposta não reduz a intensidade da agressão, acompanhado de bactérias altamente virulentas que liberam enzimas proteolíticas, enzimas lisossomais e radicais oxigenados liberados por neutrófilos, uma liquefação tecidual poderá ocorrer gerando exsudato e uma inflamação muito exacerbada acontecerá originando o abscesso perirradicular agudo (8, 50). Esse quadro clínico pode ser caracterizado por dor espontânea, pulsátil, lancinante e localizada, podendo ser acompanhada por edema facial e apresentar envolvimento sistêmico. Este quadro também apresenta potencial de se difundir para os seios e outros espaços faciais de cabeça e pescoço, para formar celulite (56). Com a cronificação desse processo a origem de um abscesso perirradicular crônico pode ser definido, caracterizado pela presença de uma fístula intra ou extra-oral (57).

Em decorrência da persistência da agressão bacteriana oriunda do canal, a qual não foi eliminada por mecanismos de defesa inata, ocorre a cronificação do processo (55). Neste processo, a resposta imune adaptativa com caráter de especificidade age na tentativa de impedir a disseminação além dos tecidos periapicais (51). Produtos dessa resposta podem ocasionar em último caso, a destruição óssea alveolar (52). Essa destruição dependerá da intensidade da agressão microbiana, que levará em consideração o número de microrganismos patogênicos e seu grau de virulência (49, 58). Siqueira Jr. e Roças (50) relatam que as bactérias exercem a sua patogenicidade causando danos aos tecidos do hospedeiro através de fatores bacterianos que envolvem produtos secretados por bactérias, incluindo enzimas, exotoxinas e produtos metabólicos finais. Além disso, os componentes estruturais bacterianos, incluindo peptidoglicano, ácido lipoteicóico, fimbrias, flagelos, proteínas e vesículas da membrana externa, DNA, exopolissacarídeos e lipopolissacarídeo, podem ser transferidos para os tecidos perirradiculares e atuam estimulando o desenvolvimento de reações imunes do hospedeiro que podem ser capazes não só de defender o hospedeiro contra a infecção, mas também de causar grave destruição tecidual (50).

Em relação a resposta inflamatória observada no diagnóstico de periodontite apical assintomática crônica (52), observou-se respostas imune adaptativas do tipo 1 e do tipo 2. A resposta imune do tipo 1 pode ser caracterizada pela produção de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 na fase de progressão da lesão periapical. Enquanto, a resposta imune do tipo 2, caracterizada por citocinas do tipo IL-10 e IL-4, podem ser produzidas em fases mais tardias da lesão e a posterior responsáveis pela estabilização da lesão (59). Estudos também demonstram o envolvimento da resposta Th17 na osteoclastogênese (41, 60). Esta pode estar envolvida na progressão de lesões periapicais (42, 60). Por outro lado, as células Tregs também participam na regulação da lesão periapical, uma vez que estas organizam a resposta imune e atuam na manutenção da tolerância imune periférica, inibindo a atividade das células T efetoras (41). No contexto do metabolismo ósseo, estas células parecem ser capazes de suprimir a formação e função de osteoclastos (41, 42). Yang et al. (42) demonstram que o desequilíbrio de Th17, principalmente IL-17 e células Tregs em lesões periapicais induzidas em rato, podem ter papel fundamental na progressão da lesão (42). Além disso, macrófagos ativados podem continuar produzindo mediadores

quimiotáticos como a IL-8 (55). A IL-1 consiste na citocina mais encontrada em lesões periapicais humanas, seus efeitos locais incluem aumento da adesão de leucócitos às paredes endoteliais, estimulação de linfócitos, potenciação de neutrófilos, ativação da produção de prostaglandinas e enzimas proteolíticas, aumento da reabsorção óssea e inibição da formação óssea (8). Dentre a família do TNF- $\alpha$ , está o ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B (RANKL), que consiste em uma citocina envolvida tanto na regulação fisiológica, quanto patológica, da osteoclastogênese e da ativação dos osteoclastos (9, 10).

Para que ocorra a reabsorção óssea, células multinucleadas podem ser recrutadas pela ação das citocinas fator estimulador de colônia 1 (CSF-1) e pelo RANKL, produzido por linfócitos T e fibroblastos, ocorrendo então sua aderência ao osso, seguida pela diferenciação celular em osteoclastos maduros (61). A atividade do osteoclasto pode ser iniciada pela estimulação de RANKL que induz a secreção de prótons e enzimas líticas no vacúolo de reabsorção formado entre a superfície basal do osteoclasto e a superfície óssea. A acidificação destes compartimentos pela secreção dos prótons leva a ativação das enzimas fosfatase ácido tartarato resistente (TRAP) e catepsina K (CATK), principais enzimas responsáveis pela degradação do osso mineral e das matrizes de colágeno, levando ao processo de reabsorção óssea (9). Processo demonstrado por Lima et al. (33) observado na figura 1 (33).

No interior da reabsorção, células da resposta imune como linfócitos T, B e macrófagos constituem a maior parte do infiltrado inflamatório, sendo que linfócitos T parecem estar em maior número, avaliados na fase crônica da doença (62). Conseqüentemente, uma lesão periapical pode permanecer assintomática por longo período de tempo, mas em qualquer período o equilíbrio delicado que prevalece no periápice pode ser perturbado por um ou mais fatores que favorecem a flora microbiana dentro do canal radicular (56). Bactérias podem avançar para os tecidos periapicais e a periodontite apical crônica espontaneamente se tornar aguda com manifestações clínicas como abscesso agudo secundário (55).

Diante do processo imune envolvido frente a agressão do tecido pulpar, a presença de algumas proteínas são de extrema importância para se desenvolver e manter uma resposta imune eficiente para destruição de patógenos envolvidos (63). Como exemplo, as proteínas *Heat shock* (Hsp) envolvidas nas respostas de stress, essas podem participar na resposta imune inicial, visto que parecem estar envolvidas

no aumento da produção de TNF por macrófagos (63-65). A Hsp72 ativa vias de transdução de sinais que resultam na estimulação de resposta inflamatória, liberando citocinas inflamatórias como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-12; óxido nítrico e quimiocinas incluindo MIP-1, MCP-1 (63). Apesar do conhecimento de várias proteínas relacionadas ao processo de resposta pulpar, em especial de proteínas relacionadas a resposta imune, poucos estudos utilizaram ferramentas proteômicas para um maior conhecimento geral de outras proteínas envolvidas neste processo. Desta forma, novos estudos no contexto pulpo-perirradicular são motivados a utilizar ferramentas proteômicas para expansão dos conhecimentos na área.





## 2.3 PROTEÔMICA GERAL

O termo proteoma refere-se ao conjunto completo de proteínas expressas pelo genoma, encontradas em células vivas, tecidos ou organismos, analisados de uma maneira ampla no contexto do tecido, celular ou em determinada condição (66). O termo proteômica foi utilizado inicialmente na década de 90, definido como um campo de estudo e tecnologia que se propõe analisar de forma ampla o conjunto de proteínas (67). Estas, por sua vez, manifestam como estruturas expressas em uma célula ou tecido, caracterizando o resultado da transcrição de genes, tradução e síntese até à modificação da proteína pós-tradução (66, 67). A análise global proteica, que representa a principal entidade funcional da célula, constitui o principal nível de informação para compreender como funcionam as células (68). Para caracterizar processos de mecanismos e funcionamento interno das células, é preciso avaliar a composição dinâmica e a localização dos componentes moleculares. Assim, todos os processos celulares envolvem proteínas e sua caracterização, desta forma, atraindo maior interesse dos estudos, ao longo dos anos (69).

As análises proteômicas podem ser ferramentas úteis tanto na identificação de biomarcadores de diagnóstico, tratamento e preservação, como também na análise do perfil de proteínas aumentadas ou diminuídas (9, 70), ganhando destaque no campo da pesquisa de doenças (71, 72). Além de culturas celulares (9), tecidos (11, 73), plasma (11) e soro (11) de pacientes podem ser fontes alternativas para o estudo da expressão diferencial, especialmente para abordagens proteômicas (73).

A eletroforese bidimensional (2DE) consiste em um método utilizado para comparar a expressão proteica de duas amostras ou mais e foi o método mais utilizado durante anos (69). Nesta técnica, as proteínas extraídas de várias amostras podem ser separadas de acordo com o seu ponto isoelétrico na primeira dimensão e dependendo da sua massa molecular na segunda dimensão, num gel de poliacrilamida (73). Tradicionalmente, as proteínas podem ser coradas com nitrato de prata, azul de Coomassie ou corante fluorescente. Após uma digestão com tripsina em gel, a identidade das proteínas pode ser determinada por espectrometria (MS) (66). Entretanto, essa técnica apresenta várias limitações, entre elas, a variação de um gel para outro da mesma amostra, impedindo uma reprodutibilidade exata (69).

Outra limitação parece ser a coloração do gel, pois a identificação das proteínas pode ser realizada por megapixels da imagem do gel, portanto o corante tem que ser extremamente eficiente (73). Mesmo com essas limitações, a 2DE continua sendo utilizada em várias pesquisas com intuito de encontrar proteínas específicas envolvidas em determinadas doenças, quando comparadas com o conteúdo proteico saudável (73). Desta forma, Gonçalves et al. (74) observaram por análise em gel 2DE, que proteínas como albumina, hemoglobina, imunoglobulinas e proteína alfa-amidase apresentavam-se com níveis aumentados em pacientes com periodontite crônica, em comparação com pacientes saudáveis (74). Utilizando o mesmo método e com auxílio de espectrometria de massa (MS) para identificação proteica, Camisasca et al. (75) encontram as proteínas apolipoproteína A1, alfa-amilase, cistatinas, queratina 10 e precursor de lisozima em níveis aumentados em pacientes com leucoplasia oral em comparação com pacientes saudáveis (75).

Para ultrapassar as limitações das técnicas do 2DE, a metodologia bidimensional de eletroforese em gel foi proposta (DIGE-2D), essa metodologia realiza a introdução de marcador antes da migração das proteínas, permitindo uma migração simultânea de diferentes amostras em um único gel de poliacrilamida (73). Parece ser considerada uma ferramenta poderosa para a investigação de perfis de expressão proteica em múltiplos conjuntos de amostras (76). As amostras podem ser individualmente marcadas com Cy3 ou Cy5, enquanto Cy2 pode ser utilizado para marcar uma amostra reunida compreendendo quantidades iguais de cada amostra, agindo como um padrão interno (73). Após o gel pode ser colorido com azul de Coomassie de modo a permitir a identificação de proteínas por MS (73). Assim como demonstrado em estudo de Jagr et al. (77), utilizando essa metodologia proposta avaliou a expressão de proteínas hiper e sub expressas em pacientes com resistência a cárie e pacientes com alta presença da doença (77).

Entre diferentes abordagens possíveis para estudar proteínas, a espectrometria de massa (MS) parece ser cada vez mais utilizada para adquirir dados importantes para a compreensão do processo de funcionamento celular (67). Esta tecnologia está avançando rapidamente, através da aquisição de novas tecnologias, diferentes formas de preparo da amostra e análise computacional (68). E na proteômica moderna auxilia ferramentas anteriores, como a técnica 2DE (69).

A espectrometria de massa consiste em uma maneira de medir com precisão o peso molecular de uma molécula, ou mais precisamente, sua relação massa/carga ( $m/z$ ) (67, 69). Como a análise de massa utiliza campos eletromagnéticos no vácuo, as moléculas devem primeiro ser carregadas eletricamente e transferidas para a fase gasosa. Uma vez na fase gasosa, a razão  $m/z$  das moléculas pode ser determinada pelas suas trajetórias num campo elétrico estático ou dinâmico (73). Por exemplo, um filtro de massa quadrupolar pode ser ajustado para transmitir apenas íons de um  $m/z$  particular e por varrimento através de uma gama de valores  $m/z$  pode ser obtido um espectro de massa (67). Outros tipos de instrumentos de MS populares incluem instrumentos de tempo de voo quadrupolo (TOF), nos quais um filtro de massa quadrupolar pode ser acoplado a um analisador de TOF que distingue as moléculas pelos seus tempos de chegada num detector (67, 73). Alternativamente, os íons são capturados e podem ser acumulados e manipulados para posterior análise (69). Para cada proteína, vários peptídeos podem ser medidos e cada um contribui com uma pontuação de identificação de banco de dados, o que leva a uma identificação altamente confiante (67, 78).

Com o advento de tecnologias como MS, quantificações de peptídeos, proteínas e moléculas parecem ser relatadas com maior precisão (78). Sabe-se que as células podem ser caracterizadas por um elevado grau de organização espacial e bioquímica, portanto além do conhecimento das proteínas, a localização dessas proteínas consiste em grande importância para o conhecimento de suas funções (69). Ishihama (79) inclui a importância do conhecimento da expressão proteica, modificação e interação proteína-proteína (79). Desta forma, a análise deve ser o mais sensível possível (67, 79).

Vários modos de análise estão disponíveis em MS (67). Diferem marcadamente pela fonte de ionização da amostra. As principais fontes utilizadas na análise proteômica caracterizam-se da ionização por laser assistida por matriz (MALDI) e a ionização por laser de superfície (SELDI) (69, 73). Estas técnicas permitem uma ionização suave de moléculas sem fragmentação excessiva, tornando possível a análise de proteínas (73). No MALDI, a amostra pode ser co-cristalizada com a matriz e depois depositada num suporte de metal. A fonte de ionização parece ser um laser de nitrogênio que bombardeia a amostra (73). A energia transmitida pelo laser parece ser absorvida pela matriz e a entrada de energia que o faz expandir-se na fase gasosa

com as moléculas contidas na amostra. A fonte de íons MALDI pode ser acoplada principalmente a um analisador ou tempo de voo (TOF) (67, 73). Sua velocidade, sensibilidade, simplicidade e reprodutibilidade tornam uma técnica muito poderosa para a detecção e identificação de proteínas (67, 69). Uma variante do MALDI, denominada SELDI, designa uma tecnologia geralmente empregada para análise do proteoma de baixo peso molecular e utiliza várias matrizes ou chips que exploram as características cromatográficas e biofísicas das diferentes proteínas (80). Esses chips podem apresentar superfícies hidrofóbicas, de troca iônica ou com íons metálicos imobilizados, ou mesmo anticorpos, receptores, enzimas e ligantes com alta afinidade por proteínas específicas (81). Assim, após a lavagem dos compostos não ligados, uma matriz pode ser colocada sobre o chip e os espectros parecem ser obtidos por ionização com laser (73, 82). Em geral, o SELDI requer uma menor limpeza dos ruídos químicos e a supressão de íons das amostras em relação ao MALDI (81). As superfícies do sistema SELDI fornecem uma plataforma cromatográfica que captura ativamente a proteína, permitindo que ocorra apenas a ligação específica de proteínas da amostra à superfície, contaminantes e as proteínas não ligadas podem ser então removidas por lavagem do chip (73, 81). Em adição, o sistema SELDI requer uma quantidade menor de amostra, o que aumenta sua reprodutibilidade (73). A tecnologia MALDI normalmente requer um preparo e limpeza de amostras mais extensa antes da análise (81). No entanto, estas etapas podem resultar em perdas amostrais e ocasionar na diminuição da reprodutibilidade (81). No entanto, em muitas doenças, as moléculas de interesse estão frequentemente presentes em quantidades muito pequenas, tornando-as de difícil detecção, mesmo com a tecnologia SELDI (68, 73).

Deste modo, a cromatografia líquida de alto desempenho (CLAE), vem sendo muito utilizada, principalmente quando acoplada a um espectrômetro de massa LC/MS, esta técnica permite uma análise de diversas amostras de maneira automática, utilizando-se de pequenas concentrações das amostras (69). A redução no tamanho das amostras pode ser de grande interesse em bioanálises, porém quantidades pequenas de proteínas em uma mistura, apresenta desafios tanto para separação, quanto para sensibilidade de detecção, deste modo a necessidade de padrões em nano escala podem ser necessários (15, 83).

No contexto de proteômica quantitativa, uma ferramenta com grande potencial para esse objetivo corresponde a ultra-performance em nano escala de cromatografia

líquida acoplada a um espectrômetro de massa *electrospray*, nanoUPLC-MS<sup>E</sup>, utilizada para quantificação e identificação da expressão de proteínas em nano escala (15). Esse método consiste na separação de peptídeos trípticos por meio de cromatografia de ultra pressão em nano escala, os quais são analisados por um espectrômetro de massa (84). A tecnologia nanoUPLC-MS<sup>E</sup> requer uma menor concentração de amostra para análises e aumenta significativamente a capacidade de identificação de proteínas e peptídeos presentes na amostra (84). Além da possibilidade de quantificação, essa técnica permite a identificação e caracterização de proteínas e peptídeos pouco abundantes (9, 12). Este fato se deve a junção do NanoUPLC com a técnica de MS, utilizando *electro-spray* (ESI) como fonte de ionização, e assim mesmo um peptídeo pode ser suficiente para identificar uma proteína única (79). Devido a exigência mínima de amostra, compatibilidade de nanoLC e ESI em ótimas taxas de fluxo e a facilidade na manutenção, em comparação com outros métodos, tornam o nanoUPLC uma eficiente abordagem para análise proteômica (85). Em adição, a possibilidade de utilizar algoritmos de busca de dados na tecnologia nanoUPLC-MS, aumentam o desempenho do método (85).

Vários ramos da biologia utilizam técnicas proteômicas para compreensão de eventos celulares, assim como Petriz et al. (86) que utilizaram NanoUPLC/MS<sup>E</sup> para demonstrar a modulação no proteoma do ventrículo esquerdo de ratos hipertensos após treino (86). Nesse estudo, a utilização de baixa e alta intensidade do exercício altera várias proteínas relacionadas a contração muscular. Importância pode ser dada para regulação positiva da proteína DJ-1 e de proteínas antioxidantes que representam importantes efeitos cardioprotetores (86). Biling et al. (87) utilizaram a ferramenta proteômica para determinar marcadores de células tronco mesenquimais (MSC) e células estaminais embrionárias (ESC), utilizando nanoLC-MS/MS relatam um total de 137 marcadores de superfícies expressos em MSC e ESC, sendo que entre estes, 28 foram encontrados super regulados, incluindo marcadores exossomas (CD9P, CD63, CD81 e CD151), confirmando ainda a importância central desses no processo biológico que podem contribuir para regeneração tecidual (87).

Em relação a resposta imune, a proteômica contribui a cada dia mais com a identificação e correlação das funções de determinadas proteínas relacionadas com essa resposta (64, 72, 88). Pesquisas indicam que proteínas relacionadas ao stress podem ter a capacidade de modular a resposta imune celular (63, 64). Proteínas *heat*

*shock* parecem ser relacionadas com esse processo, pois além de atuarem como chaperonas celulares, participam na síntese proteica e transporte através dos vários compartimentos celulares (63, 65). Possuem papel na sinalização intracelular, mas relatos também demonstram que essas proteínas podem ser liberadas e estão presentes no ambiente extracelular em condições fisiológicas, onde desempenham função de sistema de alerta de stress para células, principalmente para células do sistema imune, com intuito de evitar a propagação da injúria (89). Além disso, podem estimular a produção de citocinas e expressão da molécula de adesão de uma gama de tipos celulares, e ainda podem fornecer sinais de maturação para células apresentadoras de antígeno através de interações mediadas pelo receptor (65).

A compreensão do funcionamento de monócitos está sendo complementada com análise proteômica, devido à importância dessas células na resposta imune, como nas ações de quimiotaxia, fagocitose e produção de citocinas (70, 90). Em adição, também desempenham papel na remodelação óssea. Neste contexto, Zeng et al. (70) demonstram o proteoma de monócitos, identificando 2.237 proteínas e correlacionando suas funções e localização celular (70). Destaca-se a presença de proteínas como fosfato glicerol-3 desidrogenase codificada pelo gene GPD2, anexina A2 (ANXA2), tropomiosina alfa 4 (TPM4) e gelsolin (GSN), todas ligadas ao íon cálcio (70). Estudo demonstra a associação dessas proteínas com a formação de tecido ósseo, demonstrando sua desregulação associada a osteoporose (91).

A utilização da proteômica no estudo de neoplasias está cada dia mais avançada, com informações sobre a caracterização bioquímica, proteômica e imunológica da enolase 1 (ENO1), devido a sua capacidade de desencadear uma forte resposta imune humoral e celular, o que torna esta proteína um alvo importante na descoberta sobre tumores e alvos para imunoterapia do câncer (72). Além do envolvimento em tumores, Freire et al. (9) relatam que a baixa regulação da enolase pode estar envolvida do processo de osteoclastogênese (9). Com base no estudo da osteoclastogênese, estudo analisou as proteínas do secretado celular durante a diferenciação de macrófagos em osteoclastos, através de técnica de 2DE seguida de espectrometria de massa, identificou as catepsinas envolvidas no processo de degradação da matriz óssea. Dentre estas, a catepsina K foi indicada como a protease mais importante no processo de reabsorção óssea (92).

Estudos proteômicos começam a ser incorporados na odontologia, principalmente estudos relacionados a saliva, onde uma série de proteínas e suas interações foram identificadas, suas funções apresentadas e relacionadas a diferentes patologias (93). Biomarcadores salivares foram relatados para doenças como câncer oral, representado pela superexpressão de transferrina (71) e síndrome de fibromialgia, representada pela superregulação de transaldolase e fosfoglicerato-mutase I (94). Já biomarcadores de cárie dentária podem ser difíceis de relatar devido sua natureza multifatorial, mas em estudo de Belda-Ferre et al. (13) através de métodos de identificação em nanoLC-MS/MS, observam proteínas super reguladas em indivíduos saudáveis, correspondendo a cistatina A e transglutaminase CRAa, em comparação com indivíduos saudáveis, os quais possuíam proteínas subunidade beta da hemoglobina e proteína S100-A9 superreguladas (13).

## 2.4 PROTEÔMICA E ODONTOLOGIA

As ferramentas proteômicas podem auxiliar a odontologia na identificação de fatores de risco, diagnóstico precoce, prevenção e controle sistemático que promoverão a evolução do tratamento em todas as especialidades odontológicas (95). A análise proteica pode ser favorecida pela expressão genômica em um cenário biomolecular complexo, que podem proporcionar a descoberta de novos processos patológicos e farmacológicos através do reconhecimento de biomarcadores biológicos (96).

A ferramenta proteômica contribui de forma crucial para o progresso biotecnológico na odontologia, embora tenha começado a traçar estudos apenas na década de noventa (97). Com o avanço das ferramentas proteômicas, produtos biológicos oriundos da cavidade oral como: sangue, saliva, microrganismos, esmalte, dentina, polpa, gengiva, ligamento periodontal, osso, cemento, mucosas, entre outros, podem ser melhor compreendidos e informações adicionais podem ajudar na compreensão de patologias locais e sistêmicas (95, 98). Estas amostras apresentam-se na cavidade oral em diferentes quantidades e desta forma, podem ser analisadas



por diferentes técnicas proteômicas, as quais podem identificar proteínas importantes em processos patológicos (74, 95).

Na literatura, existem diferentes ferramentas para identificação das proteínas de interesse na odontologia, como: eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) (99) e 2-DE (11, 77). No entanto, esses métodos exigem uma quantidade de amostra significativa (77). Porém, na odontologia os diferentes tipos de amostra podem se apresentar em quantidade limitada na cavidade oral. Para análise destas amostras, os métodos mais eficazes seriam a cromatografia líquida e espectrometria de massa LC/MS (100), MALDI (74), SELDI (82) e nanoLC-MS/MS (12).

Achados proteômicos na odontologia podem ser extremamente importantes para a evolução da engenharia dos tecidos dentários (95). A proteômica vem ajudando na compreensão do envolvimento de proteínas em diversas áreas da odontologia. Estudos proteômicos na periodontia vem sendo um tema bem relatado (74, 100-103). Gonçalves et al. (74) demonstram através de métodos com 2DE e MALDI-TOF, o aumento na expressão de proteínas como albumina, hemoglobina, imunoglobulinas, cistatina e alfa-amilase em indivíduos com doença periodontal (74). Em relação a gengivite, proteínas do fluido crevicular gengival (FCG) vem sendo estudado por anos (100, 103). O FCG pode ser caracterizado pelo resultado da interação do biofilme bacteriano e células do tecido periodontal, o que gera uma mistura de substâncias derivadas do soro, células de defesa e microrganismos que podem fornecer uma série de informações quanto a patologias periodontais (82). Deste modo, estudos utilizando 2DE demonstram que o FCG de pacientes com gengivite, possuía níveis mais elevados de imunoglobulina, albumina e transferrina (103). Em estudo utilizando LC/MS<sup>E</sup>, 154 proteínas foram identificadas no FCG, destas 40 correspondiam a proteínas bacterianas (100). Neste estudo, observa-se que proteínas bacterianas, virais e de leveduras encontravam-se aumentadas em indivíduos com doença periodontal generalizada severa, em comparação a indivíduos saudáveis (100). Em adição, proteínas como L-plastina e Anexina-1 também se encontravam aumentadas em indivíduos com doença periodontal (100).

Com a progressão da doença periodontal, observa-se um aumento da carga bacteriana, promovendo alterações qualitativas e quantitativas no biofilme dental (74, 102). As bactérias formam um biofilme na superfície do dente que se acumula através da colonização sequencial e ordenada de mais de 500 espécies diferentes de

bactérias, gerando comunidades multiespecíficas (103). Com a progressão temporal e na não remoção do biofilme, ocorre a perda do tecido conjuntivo e suporte ósseo, levando ao desenvolvimento de bolsas periodontais (74). A composição da placa subgingival parece ser complexa e tem sido objeto de inúmeros estudos, pois a presença de certas bactérias está associada ao pior estado periodontal, maior profundidade de cavidade e maiores índices de sangramento (104). Bactérias como *Porphyromonas gingivalis*, *A. Actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola* e *Eikenella* têm sido associadas à periodontite crônica (104). Os resultados proteômicos envolvendo *Tannerella Forsythia* revelaram alterações na sua expressão proteica, durante a formação do biofilme, sendo sua membrana externa dominada por proteínas da família do domínio C-terminal. Em adição, estas proteínas promovem uma maior resistência ao stress oxidativo, permitindo sua persistência prolongada na bolsa periodontal (105).

Os estudos proteômicos envolvendo *P. gingivalis* evidenciaram a expressão de várias proteases, incluindo fatores de virulência como RgpA, RgpB e KGP (106). Análises realizadas por gel 2-DE e MALDI-TOF-MS, revelaram que o estresse oxidativo afeta a expressão de numerosas proteínas bacterianas da *P. gingivalis* (101). Observa-se um aumento na expressão de proteínas como HtpG, GroEL, DnaK, AhpC e proteína de domínio TPR (101). Esse aumento na expressão pode ser explicado devido a natureza anaeróbica da *P. gingivalis* mas que apresenta um elevado grau de aerotolerância, permitindo-lhe sobreviver dentro de bolsas periodontais apesar da exposição a condições aeróbicas (101, 107). Neste sentido, estas proteínas parecem ser expressas para neutralizar o estresse oxidativo. Ademais, a superóxido dismutase (SOD), a hidróperóxido de alquilo redutase subunidade C (AhpC) e a rubreritina estão envolvidas na capacidade de aerotolerância do *P. gingivalis* (107).

A película adquirida e o biofilme dental também podem ser temas estudados por pesquisadores da especialidade de dentística, com intuito de encontrar biomarcadores da doença cárie (13). Deste modo, Belda-Ferre et al. (13) encontram 7.771 proteínas bacterianas e 853 proteínas humanas no biofilme de 17 indivíduos, incluindo *pool* de biofilme de 8 dentes no grupo saudável e 9 dentes no grupo de pacientes com alto índice de cárie (13). Utilizando a análise em LC/MS, os autores encontraram a proteína L-lactato desidrogenase e arginina deiminase em níveis elevados em pacientes saudáveis (13). Já em pacientes com alto índice de cárie,

proteínas envolvidas na síntese de polissacarídeos, metabolismo de ferro e resposta imune se encontravam em níveis mais elevados (13). Através de uma análise do biofilme bacteriano, por 2DE e MS, um estudo também demonstrou que a proteína DPR está relacionada com a colonização inicial e sobrevivência do *Streptococcus mutans*, em lesões de cárie (108). Com intuito de avaliar biomarcadores de cárie na polpa dentaria, Jagr et al. (77) utilizando 2DE e identificação em nLC/MS, encontraram aumento na expressão de proteínas como anexina A2, anexina A5, ATP sintase, fosfoglicerato quinase 1, proteína *heath shock* 60, tropomiosina alfa-1, isoformas de alfa-1-antitripsina e vimentina no grupo resiste a cárie. No entanto, no grupo com alto índice de cárie, proteínas como peroxirredoxina-1, succinil-CoA, Beta-2-glicoproteína e isoformas de serotransferrina e serpina B3 foram encontradas (77). Uma série de marcadores biológicos tem sido propostos para doença cárie, porém devido seu caráter multifatorial existe uma grande dificuldade na detecção de biomarcadores para doença (77, 109). Desta forma, a necessidade de maiores estudos longitudinais para identificação de biomarcadores podem ser necessários.

Outra especialidade na qual a proteômica vem sendo um auxiliar corresponde a ortodontia. O tratamento ortodôntico emprega o princípio de que forças ativam as células e matriz extracelular dos tecidos periodontais ocasionando o movimento dentário (110). Várias respostas biológicas ocasionadas em resposta ao metabolismo ósseo, reabsorção radicular e inflamação ocorrem durante o movimento ortodôntico (98). Durante o processo de remodelação óssea uma série de eventos celulares podem ser iniciados, entre eles, a expressão do fator de crescimento tumoral- $\beta$ , fosfatase alcalina, proteínas morfogenéticas ósseas, fator de crescimento, ativador do fator nuclear kappa B, osteoprotegerina, IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  (110, 111). No contexto de estudos proteômicos, vários estudos relacionados a ortodontia realizaram estas análises no contexto salivar (98, 110, 112). Ellias et al. (98) através de análise em 2DE e MALDI/TOF-TOF identificaram aumento na expressão de proteínas na saliva de pacientes antes e após a realização de movimentação ortodôntica (98). Desta forma, proteínas relacionadas a inflamação e reabsorção óssea foram encontradas de forma super expressas, entre elas, proteína S100-A9, cadeia J da imunoglobulina, cadeia alfa-1 de Ig e CRISP-3 (98).

Achados proteômicos podem mudar a prática e o estudo das patologias, uma vez que favorece a identificação de fatores de risco, assim como promove a caracterização de biomoléculas importantes para o desenvolvimento das patologias

(113). Em estudos de patologia oral, observa-se um pequeno número de pesquisas envolvendo técnicas proteômicas. Nos estudos já realizados, além de uma abordagem proteômica, também foi realizado uma associação desses dados com dados obtidos com ferramentas gênicas e metagenômicas para obtenção de uma visão mais ampla dos processos biomoleculares envolvidos (75, 113).

Dentre as possibilidades de estudo, a saliva apresenta vantagens em termos de acessibilidade e secreção, permitindo uma facilidade na coleta (94, 96). Embora essencialmente considerado um elemento de digestão precoce, a saliva constitui um biofluido heterogêneo composto de biomoléculas que podem se alterar em resposta a várias doenças, o que torna uma fonte crucial de biomarcadores de doenças locais e sistêmicas (109, 112). Os avanços das tecnologias de alto rendimento e as técnicas analíticas tornaram a proteômica uma ferramenta ideal para estudar biomarcadores salivares de várias patologias, entre elas a Síndrome de Sjogren (96, 114-116). Em relação a esta síndrome, dois novos marcadores foram demonstrados recentemente, entre eles, a profilina e a anidrase carbônica I (CA-1) (117). Essas proteínas foram identificadas através de metodologias com 2DE, LC-MS/MS e *Western Blot*, onde foi demonstrado um aumento de 3 vezes na expressão da proteína profilina e uma diminuição de 1,5 vezes, da proteína CA-1 (117).

A utilização da saliva para identificação de biomarcadores de câncer bucal também vem sendo relatada (71, 118, 119). Devido a agressividade que o câncer oral pode ter, biomarcadores podem ocasionar em diagnóstico precoce da doença, reduzindo então a morbidade e mortalidade associado ao câncer bucal (71, 75). Jou et al. (71) relacionam a proteína transferrina com vários estágios do carcinoma de células escamosas oral (CCEO), através de identificação por 2DE, MALDI-TOF/TOF, *Western blotting* e Elisa (71). Além disso, o mesmo autor também demonstrou a capacidade do peptídeo 510 da proteína salivar dedo de zinco ser um potente biomarcador de CCEO em estágios iniciais (118). Utilizando tecnologia nanoLC-MS/MS, a proteína S100A8 manifestou-se de maneira específica e sensível, para detecção de CCEO em todos os estágios da doença (119).

A análise geral sobre proteômica na odontologia demonstra que mais estudos direcionados para a formação estrutural, diagnóstico e patogênese podem ser de extrema importância e necessários (11). Porém, há um número limitado de estudos sobre a avaliação do tratamento, prevenção de doenças e prognóstico das intervenções (77). Para resumir, todas as ferramentas proteômicas podem ajudar a

preencher as lacunas dos aspectos inexplorados da saúde oral. Para tanto, novos estudos que utilizem ferramentas proteômicas podem ser necessários para elucidar e aliar esses mecanismos clínicos e laboratoriais.

## 2.5 PROTEÔMICA DO COMPLEXO DENTINO-PULPAR E REGIÃO PERIRRADICULAR

As técnicas proteômicas vem colaborando para melhor entendimento do complexo dentino-pulpar, das reações pulpares e dos tecidos periapicais, fornecendo relevantes informações para melhorias da terapêutica endodôntica (120). Portanto, uma melhor compreensão das proteínas relacionadas ao complexo dentino-pulpar parece ser imprescindível para estudo dos mecanismos de regeneração, resposta imune e avanço da engenharia dos tecidos pulpares (11).

Com avanço das tecnologias proteômicas, estruturas do complexo dentino-pulpar estão sendo melhor compreendidas (121). Compreender os eventos desde a formação do complexo dentino-pulpar pode ser necessário para identificar possíveis biomarcadores de quadros patológicos (17). Desta forma, a formação e biomineralização da dentina, denominada dentinogênese pode ser considerado um evento dinâmico e complexo (122, 123). Durante este processo, os odontoblastos desenvolvem e segregam matriz extracelular seguida da mineralização de forma organizada (78, 121). O tecido dentinário apresenta uma porção inorgânica, representando 70% de sua constituição e uma porção orgânica, representando 20% de sua composição (16). A matriz orgânica contém colágeno, proteínas não colágenas (proteoglicanos, fosfoproteínas e glicoproteínas), fosfolípidos e fatores de crescimento (99). A proteína colágena presente em maior quantidade na matriz de dentina provavelmente corresponde o colágeno tipo I, porém pode ser possível identificar os tipos III, V, VI e XII que fornecem um modelo tridimensional (3D) para a mineralização de cristais de apatita (99).

A presença de colágeno na dentina correlaciona-se estreitamente com a presença de metaloproteinase de matriz (MMPs), principalmente as MMPs 2, 9 e 20, pois essas promovem a degradação de colágeno (123, 124). As MMPs designam uma família de endopeptidases que degradam uma variedade de componentes da matriz

(125). Elas desempenham papéis importantes na morfogênese, desenvolvimento e remodelação do tecido dentinário (124). As suas expressões e atividades podem ser reguladas com a interação de inibidores específicos de tecidos de metaloproteinases (TIMPs). O desequilíbrio entre as MMPs ativadas e as suas TIMPs resultam na destruição patológica ou acúmulo de matriz extracelular (124, 125). Niu et al. (125) utilizando imunohistoquímica, ELISA e SDS-PAGE com teste de zimografia, utilizado para detectar atividade da proteína MMP-2 e 9 e TIMP-1 e 2, observaram que as concentrações e padrões de distribuição de MMP-2, MMP-9, TIMP-1 e TIMP-2 podem ser variáveis ao longo de diferentes profundidades dentinárias (125).

Em adição, componentes tais como proteoglicanos (condroitina sulfato 4/6, decorina, biglican, lumican e fibromodulina), glicoproteínas (SIBLINGs, sialoproteína óssea, osteopontina, proteína da matriz dentina-1 e sialofosfoproteína dentinária) desempenham papéis fundamentais para promover, controlar e regular o crescimento e mineralização durante a dentinogênese (124).

Para categorizar o mapa proteômico das proteínas presentes na dentina, Park et al. (99) realizou um estudo dispendioso de SDS-PAGE seguido de LC-MS/MS, para identificação de proteínas dentinárias (99). O resultado desse estudo revelou a presença de 233 proteínas, sendo algumas confirmadas por *Western Blot* e coloração imuno-histoquímica (99). Tal estudo foi um dos primeiros a classificar as proteínas dentinárias, como: enzimas metabólicas, transdução de sinal, organização celular, transporte, resposta imune, atividade do fator de transcrição, crescimento/manutenção celular, estresse e ligação de ácidos nucleicos (99). Neste estudo, o fator de crescimento (TGF)- $\beta$ 1, a fibronectina, a decorina também foram relatadas uma vez que estas inibem a proliferação celular e estimulam a diferenciação de odontoblastos (99).

Outro estudo desenvolvido por Jagr et al. (126) identificaram 289 proteínas, utilizando-se de gel 2DE e nano-LC-MS/MS, das quais 90 ainda não haviam sido relatadas no tecido dentinário (126). Neste estudo, foram identificadas 9 novas proteínas em amostra de dentina humana. Em adição, todas as proteínas encontradas no estudo foram classificadas como imunoglobulinas, proteínas de formação da matriz extracelular, formação do citoesqueleto, atividade de adesão celular, ligação à proteína do citoesqueleto, resposta imune e atividade da peptidase (126). Algumas das novas proteínas encontradas neste estudo foram: nebulina, serina / treonina semelhante à interação de tirosina da proteína 1, proteína 2 semelhante a um canal

transmembrana, secernina 1 e proteína transmembranar 198 (126). Esses achados podem fornecer uma visão futura para processos regenerativos e de reabilitação, uma vez que estas novas proteínas identificadas podem atuar como biomarcadores para regeneração tecidual (99, 126).

Com início de lesões teciduais como na cárie dentária, uma série de proteínas podem estar hiper ou sub reguladas no tecido pulpar (127). Neste sentido, Jagr et al. (77), através de 2DE e nLC-MS/MS, demonstraram a hiper expressão de cinco proteínas em amostras de dentes de pacientes com maior presença de cárie (77). Proteínas como peroxirredoxina-1, succinil-CoA, beta-2-glicoproteína, isoformas de serotransferrina e serpina B3 estavam hiper expressas em pacientes com alto índice de cárie, comparado a pacientes resistentes a cárie (77).

Estudos de proteômica envolvendo células estaminais da polpa dentária humana (DPSCs) também colaboram para pesquisas relacionadas a regeneração tecidual (127, 128). Pesquisa envolvendo células da polpa de dentes natais, dente decíduo e permanente, usando a abordagem 2DE juntamente com MALDI-TOF/TOF, demonstrou a presença de 61 proteínas em comum para todos os tipos de células-tronco (128). Além disso, as células DPSCs também foram estudadas para melhor compreensão dos eventos relacionados a regeneração tecidual, quando este tecido é acometido com lesões de cárie (127). Ma et al. (127) compararam o proteoma de células DPSCs e células estaminais da polpa dentária cariada (CDPSCs) (127). Utilizando DIGE 2D associado a MALDI-TOF/MS, os autores revelaram a identificação de 18 proteínas diferencialmente expressas entre DPSCs e CDPSCs (127). Estas proteínas diferenciais estão relacionadas principalmente a regulação celular, proliferação, diferenciação, constituição do citoesqueleto e motilidade (127). Dentre as proteínas relacionadas a proliferação celular observou-se a CCT2, a estatimina e a CLIC4. A proteína CCT2 foi identificada em maior abundância nas amostras de cárie profunda, o que pode estar relacionado a maior proliferação celular dessas células (127).

A identificação de proteínas bioativas presente no complexo dentino-pulpar pode oferecer caminho para o desenvolvimento de novas terapias clínicas (11, 14, 77, 99). Desse modo, proteínas da polpa dentária humana vem sendo estudadas. Assim, Eckhardt et al. (11) realizaram um mapa proteico pulpar, a partir de um *pool* de 5 dentes, por gel 2DE e nLC-MS/MS. Os autores identificaram 342 proteínas, que foram comparadas a proteínas plasmáticas dentinárias (11). Desta forma, observaram que

137 proteínas eram exclusivas da polpa dentária humana, 37 eram também encontradas em dentina e 103 eram comuns a polpa, ao plasma e a dentina (11). Também foi observado que proteínas relacionadas ao metabolismo e vias energéticas foram amplamente encontradas no tecido pulpar normal (11).

Além da avaliação do proteoma de tecidos normais, estudos também relatam a avaliação do proteoma do tecido pulpar, após o contato com microrganismos (12, 129). Assim, com o avanço dos microrganismos no tecido pulpar, danos teciduais ocorrem e este tecido passa a apresentar um biofilme aderido na parede do canal radicular (3, 48). Com intuito de conhecer produtos liberados por microrganismos no interior do canal radicular, estudos proteômicos vem colaborando para tal progresso (12, 129). Deste modo, Provenzano et al. (12) avaliou o metaproteoma de quadros de infecções endodônticas de abscessos periapicais agudos e periodontite apical assintomática. Neste estudo, amostras do canal radicular foram obtidas antes e após a realização do tratamento químico-mecânico com clorexidina e hipoclorito de sódio, como irrigantes (12). A análise proteômica por nLC-MS/MS demonstrou que anteriormente ao tratamento com as soluções irrigadoras, foram identificadas 173 proteínas microbianas nos casos de abscesso periapical agudo e 88 proteínas nos casos de periodontite apical assintomática. Os autores relacionam esta maior identificação proteica a um maior número de espécies bacterianas encontradas nos casos de abscessos (12, 56). No entanto, após a realização do tratamento químico-mecânico, com a clorexidina 2%, o número total de identificações proteicas reduziu de 74 proteínas para 34 (12). Já quando foi utilizado o hipoclorito de sódio 2,5%, o número total de identificações proteicas aumentou de 14, para 35. Este estudo encontrou um total de 139 proteínas humanas, sendo a maioria delas relacionadas ao metabolismo proteico e a resposta imune (12). Investigando proteínas relacionadas ao processo de necrose pulpar, Nandakumar et al. (129) utilizando nanoLC-MS/MS identificaram proteínas da membrana externa, provavelmente envolvidas em processos patogênicos, como por exemplo adesinas, autolisinas, proteases, fator de virulência e proteínas de resistência a antibióticos (129).

Diferentes alterações teciduais podem ocorrer no tecido pulpar e/ou perirradicular, quando estes estão expostos a algum tipo de agressão. Estudos proteômicos oferecem informações relevantes para melhor entendimento do processo da evolução patológica destes tecidos. Porém, uma quantidade discreta de trabalhos relacionados a proteômica pulpar e perirradicular é observada. Neste sentido, apenas



uma pesquisa sobre o perfil proteico de polpa normal foi relatada, além de outros dois, relacionados a estudos proteômicos de infecções endodônticas. No entanto, uma análise proteômica comparativa da evolução clínica de patologias do complexo pulpo-perirradicular ainda não foi estabelecida. Desta forma, o desenvolvimento de novas pesquisas sobre o assunto torna-se necessário. A pesquisa realizada tem o intuito de demonstrar um mapa proteômico de diversas condições clínicas da polpa dentária humana, correspondendo aos diagnósticos de polpa normal, pulpite irreversível e necrose pulpar com presença de lesão perirradicular visível radiograficamente. Este conhecimento pode auxiliar na compreensão da evolução da patologia do complexo pulpo-perirradicular, além de auxiliar em pesquisas futuras na definição de biomarcadores para terapias regenerativas ou para o desenvolvimento de novas formas terapêuticas na endodontia.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Analisar de forma qualitativa proteínas presentes no tecido pulpar em condições clínicas de polpa normal, pulpite irreversível e necrose com lesão periapical visível radiograficamente.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o mapa proteômico dos quadros clínicos de polpa normal, pulpite irreversível e necrose em nanoUPLC/MS<sup>E</sup>.
- Identificar proteínas do tecido pulpar em banco de dados humano *UniProtKB/Swiss-Prot* com auxílio do software *ProteinLynx Global Server* (PLGS) versão 2.5.2.
- Classificar as funções das proteínas exclusivas e comuns aos grupos de polpa normal, pulpite e necrose.
- Identificar e agrupar proteínas de cada diagnóstico clínico em relação a sua localização celular.
- Analisar comparativamente a proteômica qualitativa entre os grupos de polpa normal, pulpite irreversível e necrose.

## 4. MÉTODOS

### 4.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Este estudo se baseia na identificação de proteínas presentes em três diagnósticos clínicos diferenciais em endodontia, sendo eles: polpa normal, pulpite irreversível e necrose pulpar com lesão periapical visível radiograficamente. Para tanto, as amostras foram obtidas de dentes molares extraídos, seguindo para extração de proteínas e preparo das amostras para identificação proteica em NanoUPLC-MS<sup>E</sup>. Posteriormente a identificação, foram realizadas comparações entre as proteínas identificada em cada um dos grupos experimentais (figura 2).

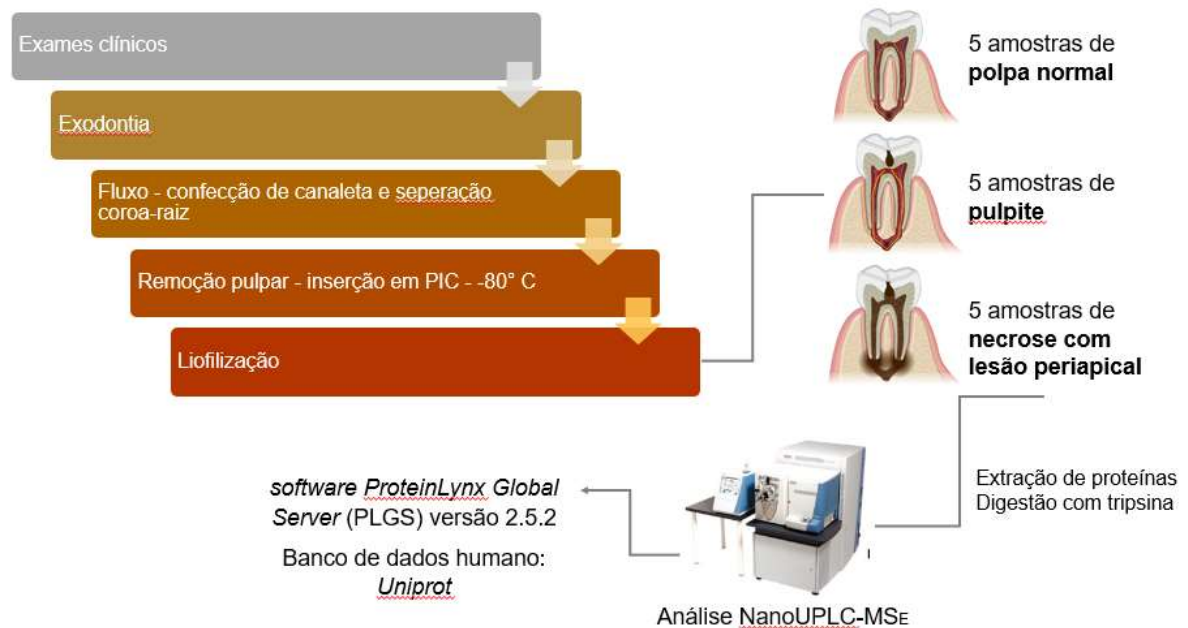


Figura 2 – Esquema representativo da metodologia utilizada para identificação de proteínas.

## 4.2 AMOSTRAS POPULACIONAIS

Foram convidados a participar da pesquisa, pacientes encaminhados a cirurgia na clínica odontológica, da Universidade Católica de Brasília (UCB), do Hospital Universitário de Brasília (HUB) e do Hospital Regional de Taguatinga (HRT). Primeiramente, os pacientes passaram por uma triagem onde foi realizada anamnese. Em seguida, foi realizado exame clínico intrabucal e extrabucal para avaliação e confirmação da necessidade da realização de exodontia. Todos pacientes assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), autorizando a utilização do elemento dentário extraído para esta pesquisa científica.

### 4.2.1 Critério de Inclusão

Foram selecionados para esta pesquisa apenas pacientes com idade superior a 18 anos. Encaminhados para exodontia de molares, devido ao comprometimento da coroa por lesões cariosas extensas, as quais não havia possibilidade de reabilitação restauradora (130). Esses dentes foram enquadrados nos diagnósticos de necrose com lesão periradicular visível radiograficamente ou pulpíte irreversível. Casos de lesões periapicais extensas, também foram enquadrados nos casos de dentes com diagnóstico de necrose pulpar (130). No grupo controle, foram inclusas polpas normais de terceiros molares hígidos, com indicação de exodontia por razões ortodônticas, traumatismos de tecido mole ou ausência de antagonista (131-133). Somente foram inclusos dentes com ápice fechado em todos os diagnósticos clínicos.

### 4.2.2 Critério de Exclusão

Os critérios de exclusão adotados foram pacientes com idade inferior a 18 anos. Além disso, casos de ápice radicular aberto e pacientes com doença periodontal generalizada severa foram eliminados da amostra. Além de dentes extraídos devido

fratura radicular ou com diagnóstico de necrose pulpar, porém sem avaliação radiográfica de lesão periapical, não foram incluídos na pesquisa. Em relação a pacientes com casos de patologias sistêmicas como diabetes mellitus, alterações cardíacas, doenças imunológicas, hematológicas e doenças infecciosas que poderiam influenciar na análise proteômica, foram utilizados os critérios de exclusão (12). Informações adicionais, como medicações utilizadas, foram relatadas no prontuário de cada paciente, para posterior análise e interpretações de dados.

#### 4.3 EXAME CLÍNICO PARA DIAGNÓSTICO

Anteriormente ao procedimento de extração dentária, uma anamnese minuciosa foi realizada, atentando-se a queixa principal e a história progressiva da dor. Questionamentos sobre as características da dor foram realizadas (dor espontânea, provocada e duração da dor) (29). Assim como, a localização da dor - irradiada, difusa, reflexa ou localizada. Também foi realizado exame clínico intra e extra oral por palpação, inspeção e percussão vertical e horizontal (3). Todos os testes foram acompanhados de realização de radiografia periapical e panorâmica. Teste de sensibilidade pulpar ao frio, com utilização do gás refrigerante tetrafluoreto (Endo-Ice, Maquira Dental, Maringá, Paraná, Brasil) foram realizados. Para tanto, inicialmente foi realizado isolamento relativo do dente e aplicação do gás em uma mecha de algodão apreendida em uma pinça (Golgran, São Caetano do Sul, SP, Brasil) e levou-se primeiramente, ao dente homólogo e após, no dente amostral (134). Os resultados entre o dente amostral e controle foram registrados e comparados entre si para fechamento do diagnóstico. As características dolorosas após realização dos testes foram interpretadas segundo Siqueira Jr e Lopes (2011), apresentado na tabela 1 (7, 134).

Tabela 1 - Métodos de diagnóstico de alterações pulpares utilizadas no estudo.

<b>Diagnóstico</b>	<b>Sintomatologia</b>	<b>Teste Frio</b>	<b>Percussão Vertical</b>	<b>Radiografia</b>
<b>Normal</b>	Ausente	Positivo	Negativo	Normal
<b>Pulpite Irreversível</b>	Dor espontânea; aguda, latejante, persistindo após remoção da causa	Resposta rápida e intensa	Negativo ou positivo	Normal ou com espessamento do espaço periodontal
<b>Necrose pulpar com periodontite apical assintomática</b>	Assintomático	Negativo	Negativo ou positivo	Área radiolúcida perirradicular

#### 4.4 OBTENÇÃO DE POLPA DENTÁRIA HUMANA DOS DENTES EXTRAÍDOS

Após a realização do diagnóstico pulpar, os dentes foram extraídos e alocados em um tubo tipo falcon contendo 10 mL de Meio *Eagle Modificado por Dulbecco* - DMEM (Gibco®, Grand Island, NY, EUA), com 200µL de fungizone anfotericina B (Sigma Aldrich®, St Louis, EUA) e 10 µL de gentamicina (Sigma Aldrich®) (135). O conjunto foi transportado ao laboratório da unidade de Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, no Centro de Análises Proteômicas e Bioquímicas (CAPB), da Universidade Católica de Brasília (UCB). Em câmara de fluxo laminar foi realizada a remoção dos tecidos moles residuais e cimento utilizando curetas periodontais (Neumar, São Paulo, SP, Brasil). Com auxílio de um disco de carborundum (Labordental, São Paulo, SP, Brasil) acoplado em peça reta (Kavo, Joinville, SC, Brasil), foi realizado um sulco na junção amelo-dentinária, nos dentes com diagnóstico de pulpite irreversível e polpa normal (11). Para dentes com diagnóstico de necrose pulpar, foi realizado um sulco na região axial ao longo eixo do dente. Após, os dentes foram fraturados utilizado um esculpador Holleback nº 03 (Golgran, São Caetano do Sul, SP, Brasil). Assim, as polpas dentárias normais e inflamadas foram removidas com auxílio de pinça (Golgran) e limas endodônticas tipo

K 15 ou 10 (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Suíça), nos casos de diagnóstico necrosado, curetas periodontais (Neumar) foram utilizadas para remoção do tecido (11). O conteúdo pulpar foi transferido para um tubo tipo *Eppendorf* (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha), contendo inibidor de proteinase (PIC) 0,1 % (Sigma-Aldrich®) e imediatamente congelado a -80 °C (12).

#### 4.5 DEFINIÇÃO DE GRUPOS E REALIZAÇÃO DE *POOL*

O conteúdo pulpar dos dentes com mesmos diagnósticos clínicos (polpa normal, pulpíte irreversível e necrose pulpar com comprometimento periapical visível radiograficamente) foram agrupados em *pools* de 5 dentes e então, liofilizados (11, 12). Os diagnósticos clínicos de polpa normal e necrose foram representados por três réplicas biológicas, contendo *pool* de 5 dentes escolhidos de forma aleatória, em cada uma delas, totalizando 15 dentes para esses diagnósticos. Polpa com diagnóstico de pulpíte irreversível foi representado apenas por 2 réplicas biológicas, devido a terceira réplica não manter o mesmo padrão dos resultados anteriores. Desta maneira, baseado em testes estatísticos essa réplica foi excluída, sendo considerada um *outlier*. As duas réplicas utilizadas contaram com 10 dentes e para cada réplica biológica, triplicatas técnicas foram realizadas.

#### 4.6 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO PROTEICA

Após a liofilização, iniciou-se o processo de extração proteica. Para tanto, foi adicionado 360 µL de solução de Lise (20 mM Tris-HCl pH 8,3, 1,5 mM KCl, 10 mM DTT, 1 mM PMSF 0,1%) (15) e então, a amostra foi submetida a sonicação durante 10 minutos (min), sendo realizada em 10 ciclos, de 1 minuto, com repouso em gelo por 1 minuto, em ultrassom (Sonics & Materials Inc., Newtown, Connecticut, EUA), com potência de 3,0 W.mL<sup>-1</sup> (11). Em seguida, a amostra foi incubada em gelo por 30 min, seguidos por centrifugação com 14000 rpm, 15 min, a 4 °C, sobrenadante recolhido e sedimento descartado. Em seguida, o conteúdo proteico foi quantificado

utilizando-se o método Bradford. Para tanto, foram utilizados 10  $\mu\text{L}$  da amostra e 190  $\mu\text{L}$  do reagente (*Bio-Rad protein assay*, diluição segundo fabricante), após 15 min, a placa foi levada ao espectrofotômetro e a leitura realizada com absorvância de 595 nm. As absorvâncias adquiridas foram comparadas com uma curva padrão de albumina bovina (BSA) ( $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$  a  $0,03125 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) (Sigma-Aldrich®), obtendo assim, os valores da concentração de proteína nas amostras (136).

## 4.7 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

### 4.7.1 Solução de Digestão com Tripsina

Foram transferidos 100  $\mu\text{L}$  de cada amostra a uma concentração padrão de 1  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do estoque para um tubo tipo *ependorf* (Eppendorf) e realizada liofilização de todos os grupos. Após, 10  $\mu\text{L}$  de 50 mM de  $\text{NH}_4\text{HCO}_2$  (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) foi adicionado e em seguida, adicionou-se 25  $\mu\text{L}$  de solução RapiGest SF (Waters, Manchester, UK) e o conteúdo foi levado ao agitador (Daigger®, Vernon Hills, Illinois, EUA). Em seguida, o tubo foi aquecido em uma temperatura de 80 °C, por 15 min e submetido a uma centrifugação de 15 segundos (s), em 3500 rpm. Foram então adicionados 2.5  $\mu\text{L}$  de 100 mM dithiothreitol (GE Healthcare, Fairfield, CT, EUA) e em seguida, a amostra foi levada ao agitador (Daigger®) e incubada em 60 °C, por 30 min. Após o período de incubação, as amostras foram deixadas em temperatura ambiente e após esfriamento, adicionou-se 2,5  $\mu\text{L}$  de 300 mM iodocetamida (GE Healthcare), seguida por agitação (Daigger®). Após, as amostras foram deixadas em temperatura ambiente por 30 min, protegidas de luz. Em seguida, foi adicionado 10  $\mu\text{L}$  de solução tripsina (Promega, Madison, EUA), em 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (Vetec) e esta, encaminhada ao agitador (Daigger®). A amostra foi agitada e incubada a 37 °C em agitação, por 14 h. Após a digestão, 10  $\mu\text{L}$  de 5 % de ácido trifluoroacético (Mallinckrodt, St. Louis, MO, EUA) foram adicionados e novamente a amostra foi levada ao agitador (Daigger®) e as amostras foram incubadas a 37 °C, por 90 min. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 14000 rpm, por 30 min a 6 °C, o sobrenadante foi transferido para um tubo tipo *Eppendorf* (Eppendorf) e as amostras foram evaporadas em concentração a



vácuo (Labconco, Kansas City, MO EUA). Após a secagem total da amostra, foram adicionados 190  $\mu\text{L}$  de 20mM formato de amônio (Sigma-Aldrich®), transferidos para frascos - *vials Waters Total Recovery* (Waters), onde foram acrescentados 10 $\mu\text{L}$  de ADH (*MassPREP Digestion Standard Alcohol Dehydrogenase*) (Waters) (15, 84, 137).

#### 4.7.2 Aquisição NanoUPLC–MS<sup>E</sup>

A separação em nano escala dos fragmentos trípticos foi realizada através de sistema nanoACQUITY™ (Waters) com tecnologia de diluição 2D. A primeira dimensão (1D) foi realizada em coluna *XBridge™* 300mm x 50mm *nanoEase™* contendo resina C18 BEH130 de partícula 5 $\mu\text{m}$ . A segunda dimensão (2D) foi realizada em pré-coluna *Symmetry C18* de partícula 5 $\mu\text{m}$ , 5mm x 300 $\mu\text{m}$  e coluna analítica de fase reversa *HSST3 C18* de partícula 1.8 $\mu\text{m}$ , 75 $\mu\text{m}$  x 150mm (Waters). Na primeira dimensão, a fase móvel A correspondeu a formato de amônio 20mM, e a fase móvel B à acetonitrila; na segunda dimensão, a fase móvel A correspondeu a ácido fórmico 0.1% em água e a fase B à ácido fórmico 0.1% em acetonitrila. Duas corridas foram realizadas: a primeira correspondeu a uma simulação 1D de 70 min para checar a digestão e quantificar a amostra; a segunda equivaleu a uma corrida 2D completa, utilizando 5 frações. Para a primeira corrida, 2  $\mu\text{L}$  das amostras foram inicialmente transferidas para a coluna 1D em 0.5 minuto numa taxa de fluxo de 2 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$  e 0.1% de B. os peptídeos foram eluídos da 1D a 2  $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$  e 65% da fase móvel B por 4 min e diluídos para a pré-coluna na 2D, utilizando uma solução aquosa de ácido fórmico 0.1% com taxa de fluxo 20 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$  por 20.5 min. Os peptídeos foram separados utilizando um gradiente de 7-40% na fase B por 54 min com uma taxa de fluxo de 500  $\text{nL}\cdot\text{min}^{-1}$  seguido de lavagem com 85% da fase móvel B. A coluna foi então reequilibrada às condições iniciais, por 10 min. Durante esse processo, a temperatura da coluna foi mantida a 35°C. O íon de referência (*lock mass*) peptídeo glu-fibrino humano (GFP) foi entregue a partir do sistema fluídico do SynaptG2 utilizando uma taxa de fluxo constante de 500  $\text{nL}\cdot\text{min}^{-1}$  a uma concentração de 320 fmol de GFP para o vaporizador de referência da fonte do *NanoLockSpray* do espectrômetro de massas. Após a aquisição, as amostras foram quantificadas usando

o método de identificação descrito no próximo item e a segunda corrida utilizando 5 frações foi realizada ajustando-se a injeção do volume para uma concentração final de 500ng. As amostras foram inicialmente transferidas para a coluna 1D em 0.5 minuto a  $2 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$  e 0.1% de B. os peptídeos para a primeira fração foram eluídos da 1D a  $2 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$  e 10.8% da fase móvel B por 2 min e diluída para a pré-coluna da 2D usando uma solução aquosa de 0.1% de ácido fórmico com uma taxa de fluxo de  $10 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$  por 8.5 min. Os peptídeos foram separados usando um gradiente de 7-35% de fase móvel B por 37 min com uma taxa de fluxo  $500 \text{nL}\cdot\text{min}^{-1}$  seguida por uma lavagem com 85% da fase móvel B por 5 min. A temperatura da coluna foi mantida a  $35^\circ\text{C}$ . os peptídeos para a segunda, terceira, quarta e quinta frações foram eluídos utilizando-se 14, 16,7, 20,4 e 50% de fase móvel B, respectivamente. As condições para diluição, taxa de fluxo e análise 2D foram as mesmas utilizadas para a primeira fração. A entrega do íon de referência em todas as frações foi feita nas mesmas condições descritas anteriormente. Todas as amostras foram analisadas em triplicatas.

Os peptídeos trípticos foram analisados em espectrômetro de massas *Synapt*<sup>®</sup> *G2 HDMS*<sup>™</sup> (Waters) com geometria quadrupolo híbrida/mobilidade iônica/aceleração ortogonal por tempo de voo (*oa*-TOF). Para todas as mensurações, o espectrômetro de massa foi operado em modo resolução com alcance típico de pelo menos 20000 FWHM (“metade do máximo da largura do total”, do inglês *full-width half-maximum*). Todas as análises foram realizadas utilizando o modo íon-positivo do nanoelectrospray (*nanoESI*+) o analisador de tempo de voo do espectrômetro de massas foi externamente calibrado com íons GFP b+ e y+ com m/z 50 a 2000 com dados de pós-aquisição dos íons de referência corrigidos usando o íon precursor dupla-carga da GFP  $[\text{M} + 2\text{H}]^{2+} = 785.8426$ . O vaporizador de referência foi ajustado para uma frequência de 30 s. Os dados de massa exata por tempo de retenção (*Exact Mass Retention Time*) do nanoLC-MS<sup>E</sup> (138) foram coletados em modos alternados de aquisição de baixa e alta energia. O tempo de aquisição do espectro contínuo, em cada modo, foi de 1.5 s com um atraso de 0.1 segundo por *interscan*. No modo MS de baixa energia, os dados foram coletados a uma energia de colisão constante de 3 eV; no modo de alta energia, a energia de colisão foi rampeada de 27 a 45 eV a cada intervalo de 1.5 s do espectro.

A radiofrequência aplicada ao analisador de massas do quadrupolo foi ajustada de tal maneira que os íons com m/z entre 200 e 2000 fossem eficientemente

transmitidos, garantindo assim que quaisquer íons com  $m/z$  menores que 200 que fossem observados no LC-MS surgissem apenas a partir de dissociações geradas na célula de colisão *TRAP T-wave* do equipamento.

#### 4.7.3 Processamento de Dados e Identificação Proteica

Os dados de espectrometria de massa obtidos por LC-MS<sup>E</sup> foram processados e comparados a um banco de dados com auxílio do *software ProteinLynx Global Server* (PLGS) versão 2.5.2 (Waters). As identificações das proteínas foram obtidas com um algoritmo de “*íon accounting*” incorporado ao programa e comparado às sequências com padrões de digestão *Mass PREP* (MPDS) *UniProtKB/Swiss-Prot* apenas ao banco de dados humano (139).

O critério de identificação de proteínas no banco seguiu a identificação de no mínimo um fragmento de íon por peptídeo, três fragmentos de íons por proteína, ao mínimo um peptídeo por proteína e a identificação permitida somente dentre 4% dos falsos positivos encontrados em uma duplicata experimental. Carboamidometilação da cisteína foi especificada como uma modificação fixa, enquanto a oxidação da metionina foi incluída como modificações variáveis. Os componentes foram agrupados com uma precisão de 10 ppm e tolerância de 0.25 minuto contra as massas dos peptídeos teóricos gerados pelo banco de dados com no mínimo 1 peptídeo. O alinhamento dos peptídeos precursores obtidos pelos dados de baixa e alta energia de colisão possui uma precisão de aproximadamente 0.05 min. Um erro de clivagem da tripsina foi permitido. As tolerâncias entre os fragmentos e os precursores foram determinadas automaticamente.

#### 4.7.4 Classificação e organização de proteínas

Inicialmente as proteínas foram separadas de acordo com o diagnóstico de cada amostra clínica. Neste sentido, elas foram classificadas em proteínas exclusivas a cada diagnóstico clínico, proteínas comuns a mais de um diagnóstico e proteínas comuns aos três diagnósticos. No momento seguinte, as proteínas de cada diagnóstico foram classificadas de acordo com suas funções e localizações. Com relação a suas funções, foram agrupadas em proteínas de: metabolismo e vias de energia, crescimento, proliferação e/ou manutenção celular, metabolismo de proteínas, regulação de nucleobases, nucleosídeos, nucleotídeos e metabolismo do ácido nucleico, atividade de remodelação tecidual e/ou formação de tecido ósseo, transporte, processo de apoptose, resposta imune, comunicação celular, sinal de transdução e adesão celular, resposta ao stress, diferenciação de células nervosas, reparo, replicação e regulação de DNA, proteínas ligadas ao íon cálcio, constituinte estrutural do citoesqueleto, regulação de proliferação celular e autofagia, constituinte da matriz extracelular e proteínas as quais não há registro de função nos bancos de dados humano Uniprot, Interprot e NCBI, caracterizadas como desconhecida. Quanto a localização, as proteínas foram classificadas em: citoplasma, núcleo, membrana plasmática, extracelular, mitocôndria, retículo endoplasmático, ribossomo e desconhecida. Esta classificação seguiu a utilizada por Eckhard *et al.* (2015).

Em momento posterior, a dinâmica das alterações proteicas foram analisadas de acordo com o agravamento da patologia pulpo-periradicular.

#### 4.8 ASPECTOS ÉTICOS

O presente estudo foi encaminhado ao comitê de ética em pesquisa com seres humanos da Universidade de Brasília, obtendo sua aprovação do ponto de vista ético, sob número 018137/2015 (Anexo 1). Os voluntários somente participaram da pesquisa após uma minuciosa explicação dos objetivos e a partir da leitura e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE.

## 5 RESULTADOS

Para identificação das proteínas presentes nos grupos de polpa normal, com pulpíte irreversível e necrose, foi utilizada a técnica proteômica nanoUPLC/MS<sup>E</sup>. Para uma maior confiabilidade dos dados, foram estabelecidas 3 réplicas técnicas e 3 réplicas biológicas para os grupos experimentais de polpa normal e necrose. Para o grupo de pulpíte irreversível, 2 réplicas biológicas e 3 réplicas técnicas foram analisadas. Para aquisição do perfil proteico foram realizadas corridas separadas de cada réplica biológica, levando-se em consideração a reprodutibilidade das réplicas técnicas e biológicas. Após a identificação das proteínas com o auxílio do banco de dados humano *Uniprot*, cada código gerado foi analisado no banco de dados humano do NCBI e no banco de dados humano Interprot (EMBL-EBI), reconhecendo a principal localização e função de cada proteína.

Desta forma, foram identificados um total de 508 proteínas. Em uma análise geral destas proteínas, observou-se do ponto de vista funcional que 7% das proteínas identificadas desempenham função relacionada ao metabolismo e vias energéticas, 2% estão envolvidas no crescimento, manutenção e proliferação celular, 2% no metabolismo de proteínas, 2% relacionadas a regulação de nucleobases, nucleosídeo e nucleotídeos, além de desempenhar papel no metabolismo do ácido nucleico. Um por cento das proteínas estão relacionadas a remodelação tecidual e/ou formação de tecido ósseo, 9% relacionadas ao transporte, 4% ao processo de apoptose, 15% a processo de resposta imune, 5% a comunicação celular, sinal de transdução e adesão celular, 7% a stress celular, 1% a diferenciação de células nervosas, 6% ao reparo, replicação e regulação do DNA, 9% a ligação ao íon cálcio, 20% a estrutura do citoesqueleto, 2% na regulação da proliferação celular e autofagia, 3% a constituição estrutural da matriz extracelular e 5% com função desconhecida (Figura 3A). Do ponto de vista situacional, 41% das proteínas localizam-se no citoplasma celular, 24% no espaço extracelular, 14% no núcleo, 14% na membrana plasmática, 2% no retículo endoplasmático, 2% em mitocôndrias, menos de 1% em ribossomos e 2% foram desconhecidas, como visualizado na figura 3B.

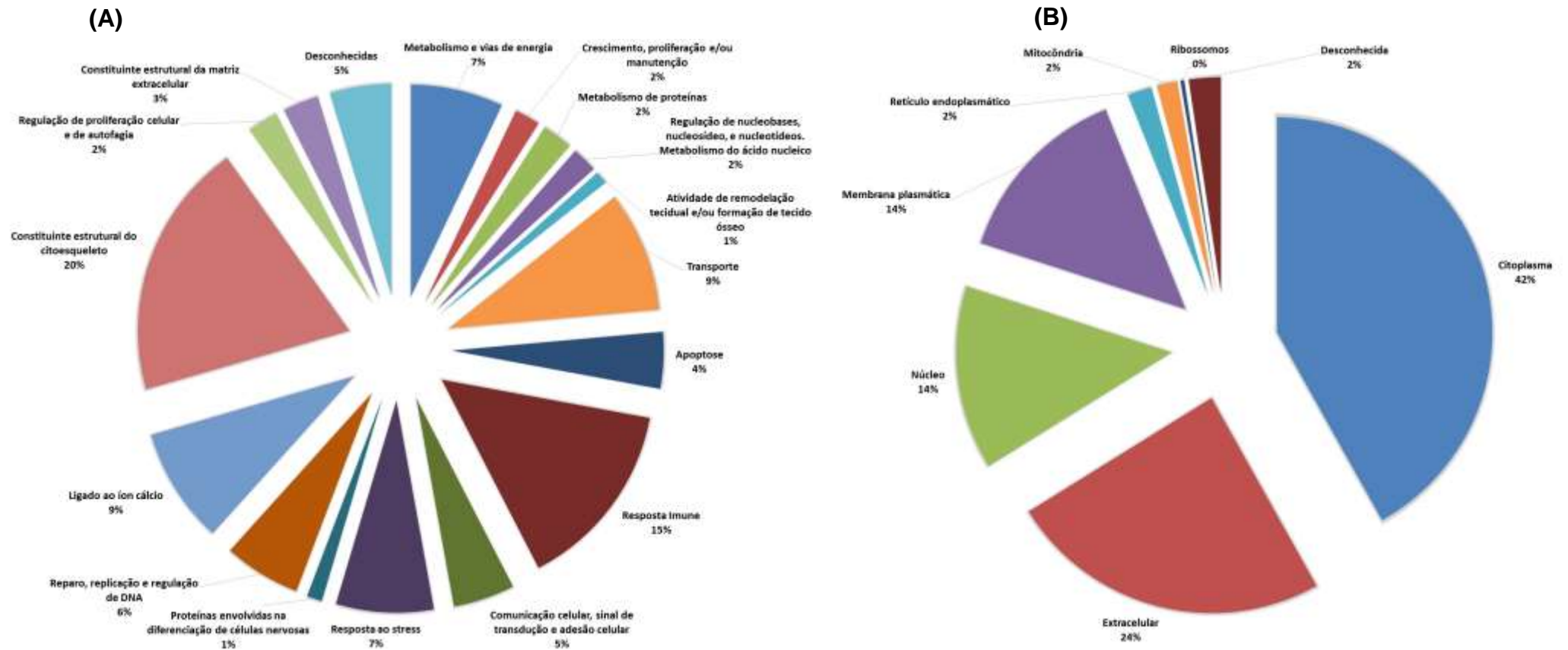


Figura 3 - Relação geral das proteínas identificadas, por nanoUPLC/MS<sup>E</sup>, observadas em todos os grupos e suas interseções, separadas por suas respectivas funções celular (A) e localização (B).

Após a análise de todas as proteínas identificadas, essas foram separadas em exclusivas a cada diagnóstico e comuns entre diferentes diagnósticos clínicos. Como demonstrado no diagrama de Venn (Figura 4), das 508 proteínas identificadas, 75 foram identificadas exclusivamente no grupo de polpas normais (Tabela 2), 59 exclusivas no diagnóstico clínico de pulpite irreversível (Tabela 3) e 120, exclusivas ao grupo com diagnóstico de necrose pulpar (Tabela 4). Nas interseções, 72 proteínas foram identificadas como comuns aos grupos de quadro clínico de normalidade pulpar e pulpite irreversível (Tabela 5). Também foi observado a presença de 37 proteínas comuns entre os diagnósticos de normalidade pulpar e necrose (Tabela 6), 36 entre os grupos de pulpite irreversível e necrose pulpar (Tabela 7). Em adição, 109 proteínas foram encontradas nos 3 diagnósticos clínicos pulpares (Tabela 8).

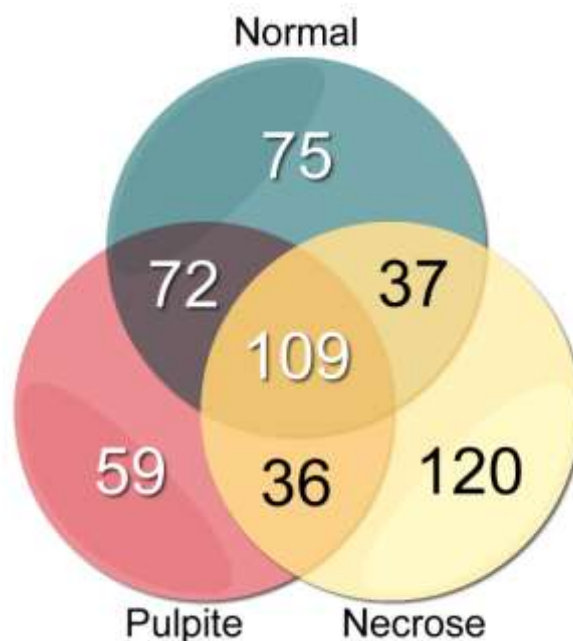


Figura 4 - Diagrama de Venn demonstrando as proteínas identificadas por nanoUPLC/MS<sup>E</sup>, correlacionando-as nos seus respectivos grupos, onde o círculo azul representa as proteínas encontradas em polpa normal, o círculo rosa as proteínas encontradas do diagnóstico de pulpite irreversível e o círculo amarelo as proteínas identificadas em necrose. As proteínas foram apresentadas conforme sua classificação entre: proteínas exclusivas de cada grupo, proteínas comuns a todos os grupos e proteínas comuns a determinados grupos.

## 5.1 PROTEÍNAS EXCLUSIVAS A CADA DIAGNÓSTICO CLÍNICO

Após a análise geral de todas as proteínas encontradas em todos os quadros clínicos, as proteínas exclusivas a cada diagnóstico foram analisadas de forma separada.

### 5.1.1 Proteínas identificadas exclusivamente em polpa normal

Dentre as 75 proteínas exclusivas em polpa normal, 7% corresponderam a função de metabolismo e vias energéticas, 7% estavam relacionadas com o crescimento, proliferação e/ou manutenção celular, 8% ao metabolismo de proteínas, 4% envolvidas na regulação de nucleobases, nucleosídeo e nucleotídeos, além da participação no metabolismo do ácido nucleico. Nesse diagnóstico, também, observou-se a presença de 5% de proteínas envolvidas na remodelação tecidual e/ou formação de tecido ósseo, 14% envolvidas no transporte, 5% das proteínas participaram do processo de apoptose, 11% na resposta imune, 4% exercem função na comunicação, sinal de transdução e adesão celular, 5% das proteínas participavam do processo de stress celular, 3% eram proteínas envolvidas na diferenciação de células nervosas, 5% desempenham função no reparo, replicação e regulação de DNA, 5% eram proteínas ligadas ao íon cálcio, 12% desempenhavam função estrutural do citoesqueleto e 5% eram proteínas que ainda não receberam funções específicas nos bancos de dados *Uniprot*, NCBI e Interprot (EMBL-EBI), sendo caracterizadas como desconhecidas. Não foram identificadas proteínas exclusivas ao quadro de normalidade pulpar, com funções relacionadas a regulação da proliferação celular e autofagia e constituinte estrutural da matriz extracelular.

O maior percentual de proteínas identificadas na polpa normal estavam relacionadas ao transporte, destacam-se a partir da maior média de cobertura para menor, as proteínas relacionadas a miotubularina 14, subunidade ATPase transportadora de potássio de sódio beta, apolipoproteína A II, fragmento da família anquirina contendo proteína 36C, proteína de ligação da vitamina D e a



ceruloplasmina, essas podem ser responsáveis pelo transporte de vários componentes biológicos essenciais para homeostase tecidual. Além desse grupo, observou-se que proteínas com função estrutural do citoesqueleto também foram bastante identificadas, destacando-se a presença das proteínas fragmento tubulina cadeia alfa 1B, fragmento tubulina cadeia beta 4A, cofilina 1 e filamina A.

Quanto a localização das proteínas identificadas, 34% pertenciam ao citoplasma, 26% ao espaço extracelular, 17% estavam localizadas no núcleo, 12% na membrana plasmática, 7% no retículo endoplasmático e 4% eram desconhecidas. Nesse grupo não foram identificadas proteínas presentes na mitocôndria e nos ribossomos. Todas as proteínas e suas respectivas funções e localizações podem ser visualizadas na tabela 2 e sua distribuição pode ser avaliada na figura 5A e 6A.

### 5.1.2 Proteínas identificadas exclusivamente no quadro clínico de pulpíte irreversível

Dentre as 59 proteínas identificadas exclusivamente no quadro clínico de pulpíte irreversível, 12% estavam relacionadas ao metabolismo e vias de energia, 2% ao crescimento, proliferação e/ou manutenção celular, 2% ao metabolismo de proteínas, 5% estavam envolvidas na regulação de nucleobases, nucleosídeo, nucleotídeos e participação do metabolismo do ácido nucleico. Também nota-se que 2% das proteínas identificadas estavam envolvidas na atividade de remodelação tecidual e/ou formação de tecido ósseo, 10% a função de transporte, 10% ao processo de apoptose, 14% a resposta imune, 2% a comunicação, sinal de transdução e adesão celular, 5% estavam envolvidas na resposta ao stress celular, 3% a diferenciação de células nervosas, 8% ao reparo, regulação e replicação de DNA, 3% ao íon cálcio, 12% relacionadas aos constituintes estruturais do citoesqueleto e 10% ainda não apresentavam função conhecida. Nesse grupo não foram encontradas proteínas relacionadas a regulação de proliferação celular e autofagia. Também não foram identificadas proteínas constituintes da matriz extracelular. Todas as proteínas identificadas neste quadro clínico podem ser analisadas na tabela 3 e sua distribuição na figura 5B.

Notou-se a presença de uma ampla diversidade de proteínas relacionadas a resposta imune, de acordo com sua média de cobertura, destaca-se as proteínas fragmento HCG2041210, proteína S100B, peptidil prolil cis trans isomerase, família C do receptor acoplado à proteína G grupo 5 membro C, zeta delta 14 3 3, fibrinogênio gama, vitronectina e secretogranina 2. Além dessas proteínas, pode-se destacar proteínas relacionadas ao processo de apoptose, como: alfa actinina 1 e 3, fragmento da proteína Ras relacionada a Rab 2A e clusterina.

Quanto a localização, observou-se que 47% das proteínas identificadas se encontravam no citoplasma, 19% no meio extracelular, 18% no núcleo, 8% na membrana plasmática, 2% compunha as mitocôndrias e 6% possuem sua localização desconhecida. Nesse grupo não se observou proteínas que compõe o retículo endoplasmático e os ribossomos (Figura 6B).

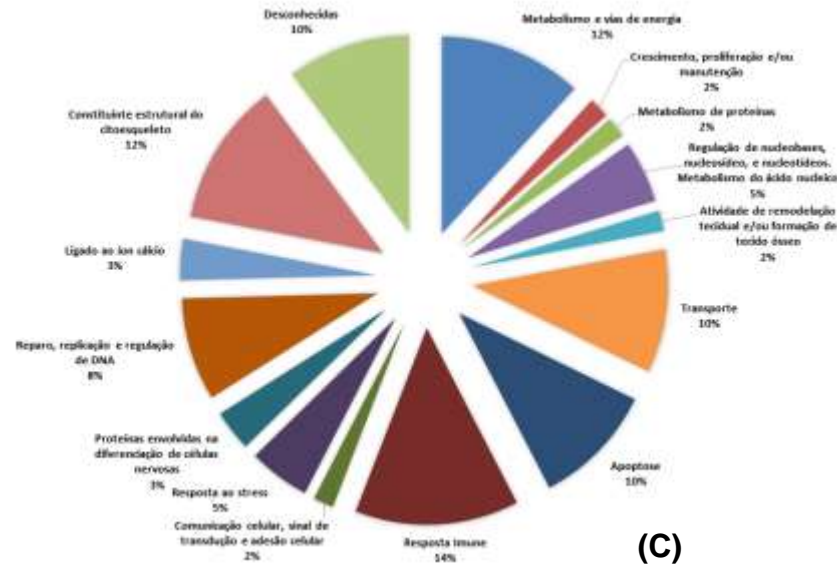
### 5.1.3 Proteínas identificadas exclusivamente no quadro clínico de necrose pulpar

Em relação as 120 proteínas identificadas de forma exclusiva nas amostras de polpa necrosada, 5% estavam relacionadas ao metabolismo e vias de energia, 3% ao crescimento, proliferação e/ou manutenção, 2% ao metabolismo de proteínas, 2% a regulação de nucleobases, nucleosídeo, nucleotídeos e participação do metabolismo do ácido nucleico. Nesse grupo, 7% das proteínas identificadas estavam envolvidas no transporte, 3% no processo de apoptose, 14% na resposta imune, 6% estavam relacionadas a comunicação, sinal de transdução e adesão celular, 10% estavam relacionadas ao stress celular, 6% no reparo, regulação e replicação de DNA, 3% relacionadas ao íon cálcio, 18% relacionadas a constituição estrutural do citoesqueleto, 10% participavam da regulação de proliferação celular e autofagia, 3% eram constituintes estruturais da matriz extracelular e 8% foram consideradas com função desconhecida. Nesse grupo, não foram encontradas proteínas que exercem função na remodelação tecidual e/ou formação de tecido ósseo e nem proteínas envolvidas na diferenciação de células nervosas. Todas as proteínas identificadas neste quadro clínico podem ser analisadas na tabela 4 e sua distribuição na figura 5C.

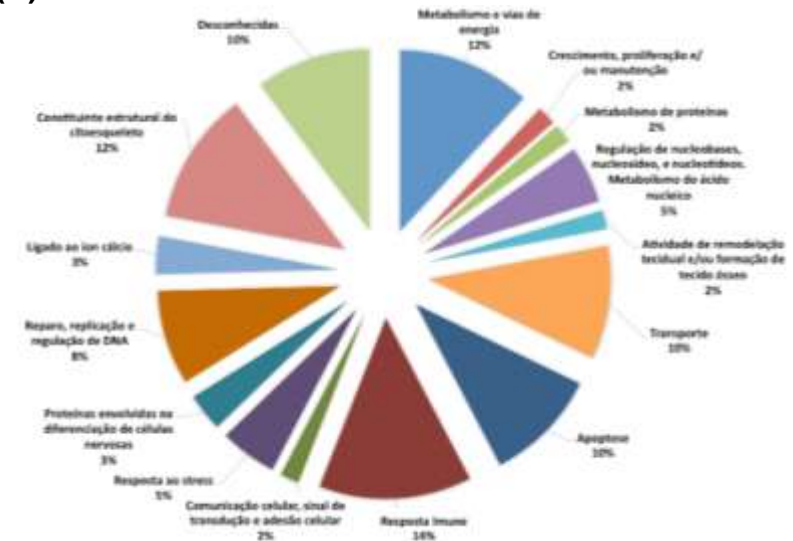
Nesse grupo, uma ampla gama de proteínas relacionadas a resposta imune foram identificadas. Dentre elas, seguindo a maior porcentagem de cobertura, várias isoformas de imunoglobulinas. Proteínas de reconhecimento de antígeno também foram identificadas, como: proteína de reconhecimento de peptidoglicano 1, HLA classe I antígeno de histocompatibilidade B 46 cadeia alfa, HLA classe I antígeno de histocompatibilidade B 13 cadeia alfa. Também foi identificada peroxidina, assim como, proteínas relacionadas as células de defesa, como: lipocaína associada a matriz neutrofílica e proteína de membrana restrita linfóide.

Quanto a localização das proteínas identificadas observou-se que 42% destas se encontravam no citoplasma, 16% no meio extracelular, 15% no núcleo, 19% na membrana plasmática, 3% no retículo endoplasmático, 1% em mitocôndrias, menos de 1% em ribossomos e 3% eram desconhecidas (Figura 6C).

(A)



(B)



(C)

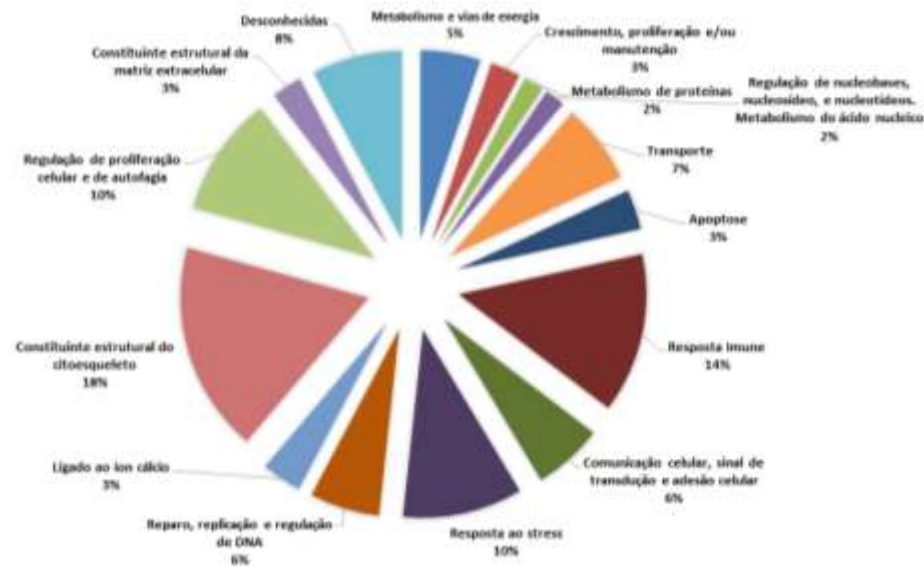


Figura 5 - Relação das proteínas exclusivas identificadas por nanoUPLC/MS<sup>E</sup> separadas por suas respectivas funções, no grupo com diagnóstico de polpa normal (A), pulpite irreversível (B) e necrose (C).

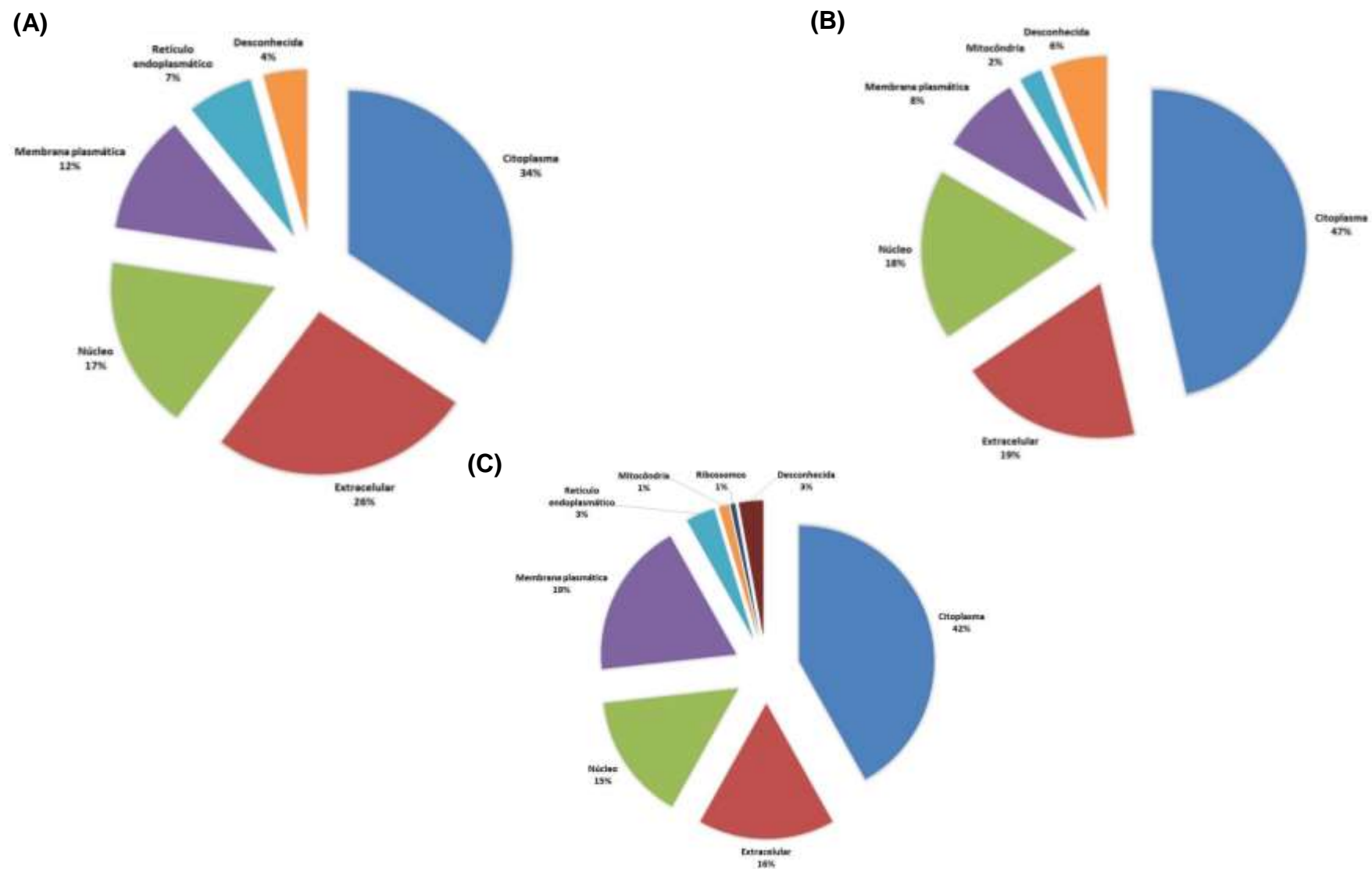


Figura 6 - Relação das proteínas exclusivas identificadas por nanoUPLC/MS<sup>E</sup> separadas por suas respectivas localizações, no grupo com diagnóstico de polpa normal **(A)**, pulpite irreversível **(B)** e necrose **(C)**.

#### **5.1.4 Comparação do panorama de proteínas exclusivas identificadas entre os grupos de polpa normal, pulpíte irreversível e necrose**

Levando-se em consideração o número absoluto de proteínas identificadas de forma exclusiva em cada diagnóstico clínico e a sua relação com função e localização, observou-se que partindo-se do quadro de polpa normal para o quadro clínico de pulpíte irreversível, foi observada uma maior identificação de proteínas com função relacionada ao metabolismo e vias de energia, assim como proteínas relacionadas ao processo de apoptose, maior diversidade de proteínas relacionadas a resposta imune e reparo, regulação e replicação de DNA. Em contrapartida, ocorre uma identificação menor de proteínas envolvidas no crescimento, proliferação e/ou manutenção, assim como de proteínas envolvidas no metabolismo proteico, remodelação tecidual e/ou formação de tecido ósseo, proteínas envolvidas no transporte, comunicação, sinal de transdução e adesão celular, proteínas ligadas ao íon cálcio e constituição estrutural do citoesqueleto também apresentaram um menor índice de identificação, comparado ao quadro de normalidade (Figura 7). Quanto a localização das proteínas identificadas, percebe-se que na pulpíte irreversível é possível encontrar uma maior diversidade de proteínas no citoplasma e proteínas desconhecidas. No entanto, foi encontrada uma redução no percentual de proteínas localizadas no meio extracelular, membrana, mitocôndria e retículo endoplasmático, no diagnóstico de pulpíte irreversível, em comparação as proteínas exclusivas identificadas em polpas normais.

Seguindo do diagnóstico de pulpíte irreversível para o quadro de necrose pulpar, observou-se a ocorrência de um aumento na diversidade de proteínas identificadas envolvidas nos processos de crescimento celular, metabolismo de proteínas, transporte, resposta imune, assim como proteínas envolvidas na comunicação, sinal de transdução e adesão celular. Além de proteínas envolvidas no stress celular, reparo, replicação e regulação de DNA, proteínas ligadas ao íon cálcio, proteínas relacionadas a constituição estrutural do citoesqueleto, proteínas de regulação da proliferação celular e autofagia, além de proteínas relacionadas a matriz extracelular se encontravam mais presentes (Figura 7). Diferentemente, foi observado que as proteínas relacionadas ao metabolismo e vias de energia, regulação de

nucleobases, nucleosídeo e nucleotídeos, proteínas com atividade de remodelação tecidual e/ou formação de tecido ósseo, proteínas envolvidas na diferenciação de células nervosas e reparo, além de proteínas envolvidas no processo de apoptose, apresentaram menor número de identificações comparando-se com o grupo de proteínas identificadas exclusivamente no diagnóstico de pulpíte irreversível (Figura 7). Partindo-se do quadro clínico de pulpíte irreversível para o de necrose pulpar com lesão periradicular visível radiograficamente, observou-se que ocorreu um aumento nas identificação de proteínas localizadas no citoplasma, espaço extracelular, núcleo, membrana plasmática, e ribossomos. Já proteínas encontradas em ribossomos foram menos identificadas (Figura 7).

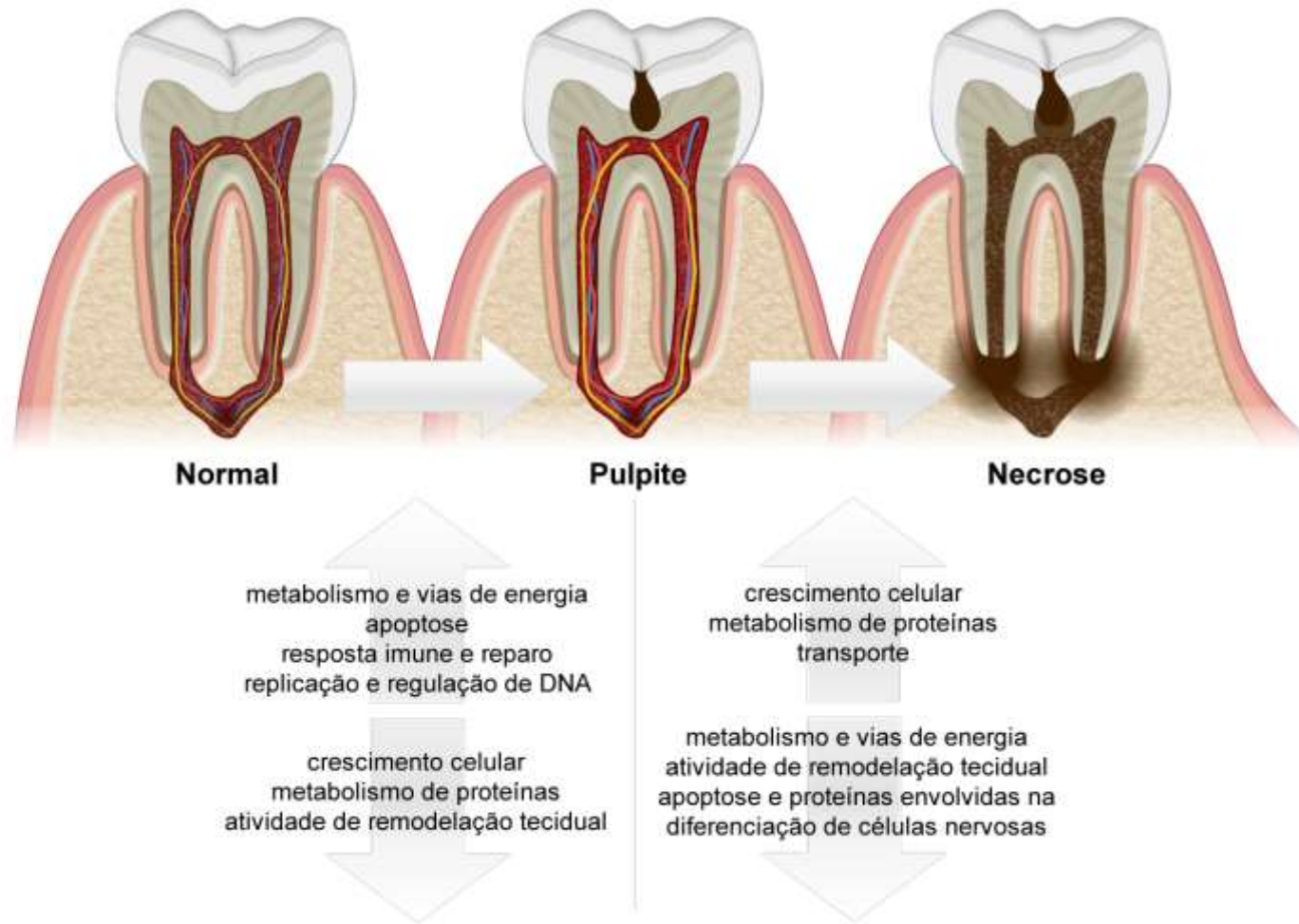


Figura 7 – Representação demonstrando as mudanças funcionais com o avanço da patologia pulpar. Identificações relacionadas ao aumento e diminuição das proteínas identificadas exclusivamente em cada diagnóstico. As setas indicam as funções em aumento e diminuição com o avanço da patologia – da normalidade a pulpite irreversível e da pulpite irreversível para a necrose.



## 5.2 PROTEÍNAS COMUNS A MAIS DE UM DIAGNÓSTICO CLÍNICO

### 5.2.1 Proteínas comuns entre polpa normal e pulpíte irreversível identificadas

Em relação as 72 proteínas comuns encontradas entre polpa normal e pulpíte irreversível, observou-se que 10% corresponde a função de metabolismo e vias de energia, 1% ao crescimento, proliferação e manutenção celular, 3% estavam relacionados ao metabolismo de proteínas, 8% ao transporte, 5% foram relacionadas ao processo de apoptose, 10% com a resposta imune, 8% com a comunicação celular, sinal de transdução e adesão celular. Também observou-se a presença de 10% das proteínas relacionadas ao stress, 3% envolvidas na diferenciação de células nervosas, 3% no reparo, replicação e regulação de DNA, 10% estavam ligadas ao íon cálcio, 25% eram constituintes estruturais do citoesqueleto, 3% estavam envolvidas na constituição estrutural da matriz extracelular e 1% estava caracterizada como desconhecida. Nesse grupo, nota-se a ausência de proteínas relacionadas a regulação de nucleobases, nucleosídeo, nucleotídeos e metabolismo de ácido nucleico. Também observou-se a ausência de proteínas envolvidas na atividade de remodelação tecidual e/ou formação de tecido ósseo e proteínas envolvidas na regulação de proliferação celular e autofagia (Figura 8A) e (Tabela 5).

A maioria das proteínas encontradas de forma comum nos grupos de polpa normal e pulpíte irreversível corresponderam a proteínas de constituintes estruturais do citoesqueleto. Seguindo uma ordem de média de cobertura, as proteínas vimentina, tubulina alfa 1A, tubulina beta 2A, actina citoplasmática e filamina A foram algumas das proteínas identificadas nesse grupo (Tabela 5).

Levando em consideração a localização celular dessas proteínas, observou-se que 48% estão dispostas no citoplasma, 28% no meio extracelular, 15% no núcleo, 8% na membrana plasmática e 1% categorizadas como desconhecidas. Não foram observadas, nesse grupo, a presença de proteínas localizadas no retículo endoplasmático, mitocôndrias e ribossomos (Figura 9A).

### 5.2.2 Proteínas comuns entre polpa normal e necrose pulpar identificadas

Dentre as 37 proteínas identificadas de forma comum nos grupos de polpa normal e necrosada, 3% estavam relacionadas ao metabolismo de proteínas, 3% ao transporte, 16% a resposta imune, 5% a comunicação celular, sinal de transdução e adesão celular, 11% a resposta ao stress, 11% ao reparo, regulação e replicação de DNA, 13% a ligação ao íon cálcio, 16% a estrutura do citoesqueleto, 11% a constituição estrutural da matriz extracelular e 11% não apresentaram função conhecida. Não foram identificadas proteínas envolvidas no metabolismo e vias de energia, crescimento, proliferação e/ou manutenção, regulação de nucleobases, nucleosídeo, nucleotídeos e metabolismo do ácido nucleico, atividade de remodelação tecidual e/ou formação de tecido ósseo, proteínas relacionadas a apoptose, proteínas envolvidas na diferenciação de células nervosas e proteínas envolvidas na regulação de proliferação celular e de autofagia (Figura 8B) e (Tabela 6).

Proteínas relacionadas ao stress foram identificadas em ambos grupos, normal e pulpíte, observou-se que das 4 proteínas identificadas, 3 eram proteínas relacionadas a proteína *heat shock* 71 kDa. Proteínas do sistema imune também foram identificadas, sendo que em sua totalidade eram proteínas relacionadas a diversas isoformas de imunoglobulinas. Das proteínas relacionadas ao íon cálcio, destaca-se a presença de anexina A1, fragmento polipeptídico de miosina 6, fibrilina e versican. O maior grupo de proteínas identificados nesta análise foi referente a proteínas relacionadas a estrutura do citoesqueleto, representadas pela proteína ribossomal ácida 60S, fragmento Moesin, tubulina alfa 1A e desmina.

Quanto a localização dessas proteínas, 30% se encontravam no citoplasma, 23% no meio extracelular, 14% no núcleo, 23% na membrana plasmática, 2% no retículo endoplasmático, 2% em mitocôndrias, 2% nos ribossomos e 4% consideradas desconhecidas (Figura 9B).

### 5.2.3 Proteínas comuns entre pulpíte irreversível e necrose pulpar identificadas

Foram identificadas 36 proteínas comuns entre as amostras de polpas com diagnóstico de pulpíte e necrose pulpar. Dessas proteínas, 5% estavam relacionadas ao metabolismo e vias de energia da célula, 3% ao transporte, 5% aos processo de apoptose, 28% a resposta imune, 3% a comunicação celular, sinal de transdução e adesão celular, 8% a resposta ao stress celular, 3% ao reparo, replicação e regulação de DNA, 14% a ligação ao íon cálcio, 25% ao citoesqueleto e 6% a constituição estrutural do citoesqueleto. Não foram observadas nesse grupo, proteínas envolvidas no crescimento, proliferação e/ou manutenção celular, proteínas envolvidas no metabolismo de proteínas, regulação de nucleobases, nucleosídeo, nucleotídeos e metabolismo do ácido nucleico. Também não foram identificadas proteínas que desempenham atividade de remodelação tecidual e/ou formação de tecido ósseo, nem proteínas envolvidas na diferenciação de células nervosas e proteínas com características de regulação da proliferação celular e de autofagia. Neste grupo, nenhuma proteína foi caracterizada como desconhecida (Figura 8C e Tabela 7).

Dentre as proteínas comuns entre os diagnósticos de pulpíte irreversível e necrose pulpar observou-se que a maioria destas eram relacionadas a resposta imune, destacando-se a presença, a partir da média de cobertura, de fragmento Ig lambda 2 região C, além de várias isoformas de fibrinogênio, proteínas relacionadas aos neutrófilos, como: dois tipos de defensina neutrofílicas. Outra função biológica com grande número de identificações proteicas foi a relacionada a constituição estrutural do citoesqueleto, representadas principalmente pelas proteínas vimentina, tubulina alfa 3E, proteína zeta delta 14 3 3 e polipeptídeo de neurofilamento.

Quanto a localização celular, 41% estavam dispostas no citoplasma, 25% no meio extracelular, 11% no núcleo, 17% na membrana plasmática e 6% em mitocôndrias. Não foram encontradas proteínas no retículo endoplasmático, ribossomos e nenhuma foi caracterizada como desconhecida (Figura 9C).

#### **5.2.4 Proteínas comuns entre polpa normal, pulpíte irreversível e necrose pulpar identificadas**

Esse é quadro com maior número de proteínas comuns, no total 109 proteínas estavam presentes de forma semelhante nos três diagnósticos clínicos. Nesse grupo observou-se que 2% das proteínas desempenhavam função na regulação de nucleobases, nucleosídeo, nucleotídeos e/ou no metabolismo do ácido nucleico. Outras 8% podem ser citadas atuando no metabolismo e vias de energia. Também foram observadas que 14% das proteínas identificadas desempenham função de transporte, 2% de apoptose, 16% de resposta imune, 4% de comunicação celular, sinal de transdução e adesão celular. Proteínas envolvidas ao stress contam com 5% das identificações, 6% estão envolvidas no reparo, replicação e regulação de DNA, 16% estão ligadas ao íon cálcio, 24% desempenham função estrutural no citoesqueleto e 3% constituem a estrutura da matriz extracelular. Não foram identificadas proteínas relacionadas ao crescimento, proliferação e/ou manutenção, nem proteínas do metabolismo proteico. Também não houve identificação de proteínas envolvidas na atividade de remodelação tecidual e/ou formação de tecido ósseo e proteínas envolvidas na diferenciação de células nervosas. Proteínas que regulam a proliferação celular e a autofagia também não foram encontradas. Não houve ocorrência de proteína desconhecida (Figura 8D e Tabela 8).

A maioria das proteínas encontradas foram proteínas relacionadas a estruturação do citoesqueleto, destacando-se de acordo com a média de cobertura a presença de fragmento cofilina 1, várias isoformas de tubulina, actina citoplasmática e filamina A. Também observou-se grande variedade de proteínas relacionadas a resposta imune, entre elas, estavam em sua maioria isoformas de imunoglobulinas e peroxidoredoxina. Por fim, em relação as proteínas identificadas do íon cálcio, observou a presença de várias isoformas da proteína anexina A2 e A5.

Quanto a localização espacial celular destas proteínas identificadas, 44% se apresentavam no citoplasma, 33% no meio extracelular, 8% no núcleo, 13% na membrana plasmática e 2% em mitocôndrias (Figura 9D).

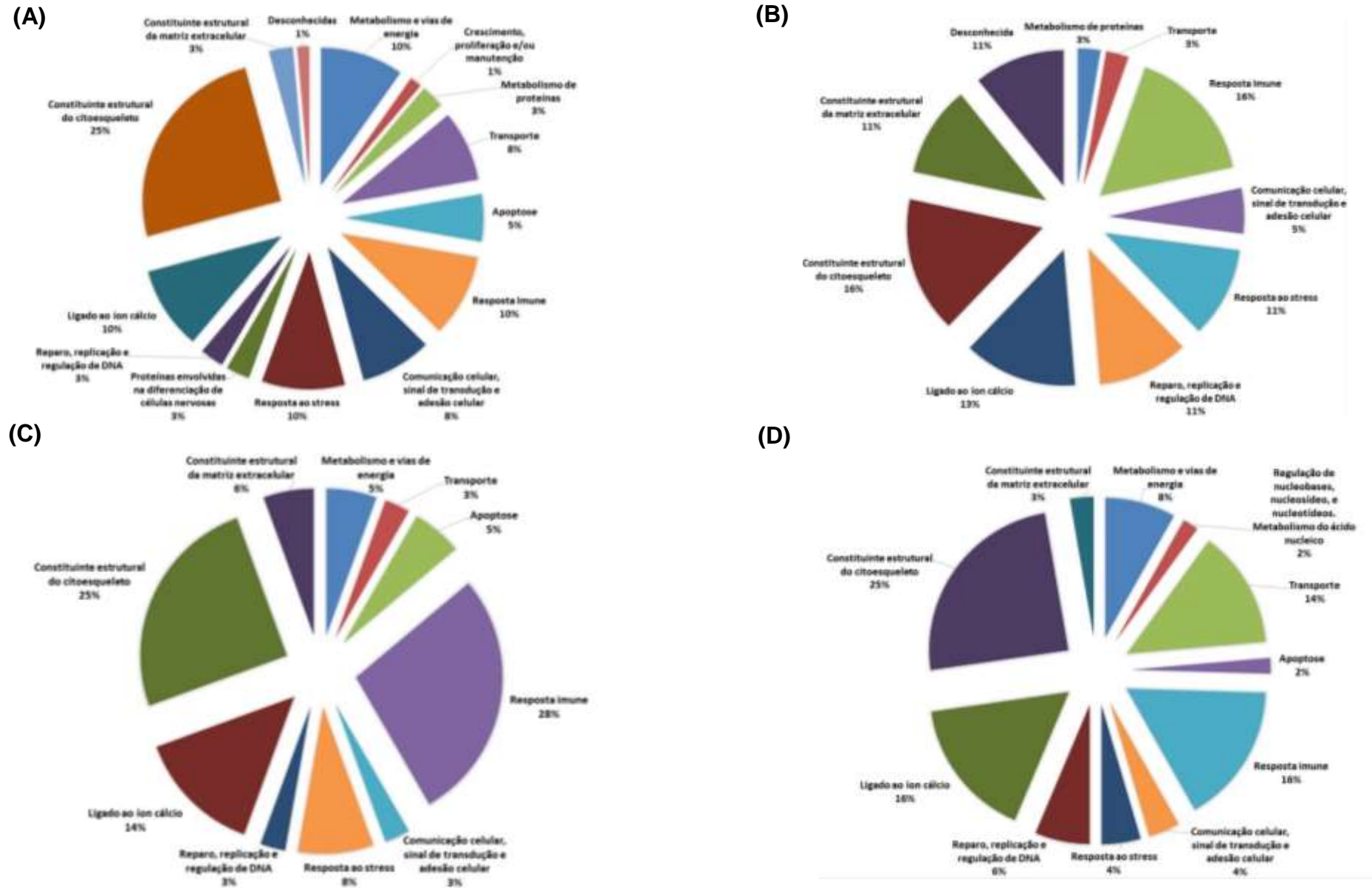
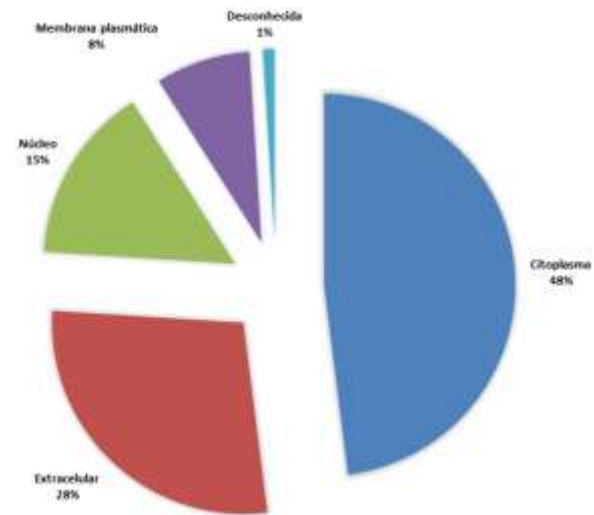
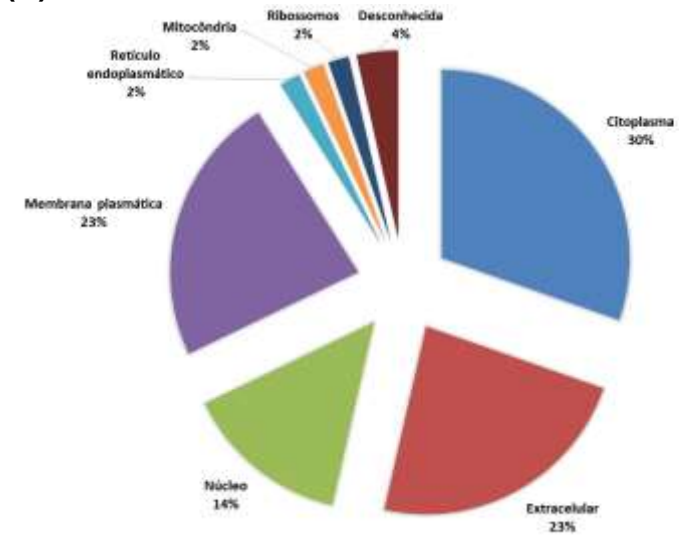


Figura 8 - Relação das proteínas comuns entre os grupos. Separadas por suas respectivas funções celular, correspondendo em polpa normal e pulpíte (A), polpa normal e necrose (B), pulpíte irreversível e necrose (C), normal, pulpíte e necrose (D).

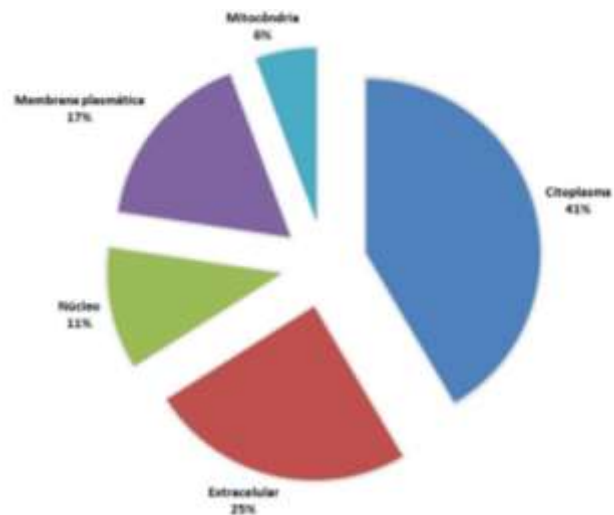
(A)



(B)



(C)



(D)

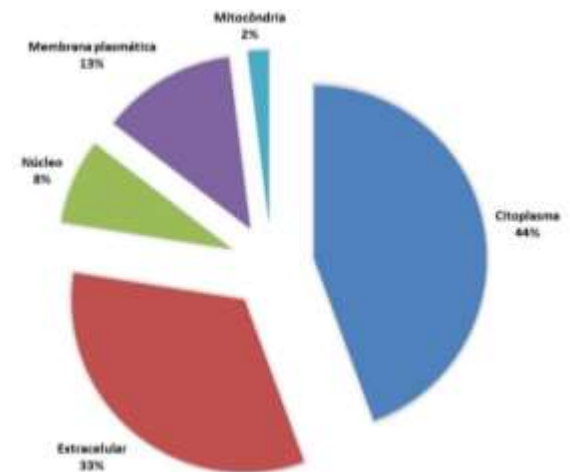


Figura 9 - Relação das proteínas comuns entre os grupos. Separadas por suas respectivas localizações celular, correspondendo em polpa normal e pulpíte (A), polpa normal e necrose (B), pulpíte irreversível e necrose (C), normal, pulpíte e necrose (D).

## 6 DISCUSSÃO

As ferramentas proteômicas podem auxiliar a odontologia na compreensão de vários eventos, incluindo a identificação de fatores de risco, diagnóstico precoce, prevenção e controle sistemático (95). Com esta compreensão, o estabelecimento de alvos para tratamento vem sendo almejado, o que vem permitindo evolução em todas as especialidades odontológicas (96). Na endodontia, a proteômica da polpa dentária humana com pulpite irreversível e necrose pode contribuir para a compreensão da patogênese da doença pulpar (12). Além disso, análise das proteínas presentes na polpa humana normal pode contribuir para avanços na área de regeneração tecidual, pulpar e dentinárias (11). Porém, nota-se um número discreto de estudos que descrevem o proteoma pulpar, tanto em situação de normalidade, quanto em quadros patológicos. Desta forma, após análise da literatura, observou-se que esse provavelmente corresponde ao primeiro estudo a realizar um mapa proteômico englobando condições clínicas de polpa normal, seguindo para presença de pulpite irreversível e um quadro de necrose pulpar. Além disso, não se observou a presença de estudos que relacionam e comparam a análise funcional das proteínas identificadas em cada diagnóstico.

Devido a presença de um número reduzido de pesquisas sobre o assunto, alguns testes prévios foram realizados. Inicialmente, definiu-se sobre o melhor método de extração proteica e a melhor forma de obtenção das amostras pulpares. Dentre as duas formas de obtenção do tecido pulpar, testou-se a utilização de polpas individuais retiradas após a realização de acesso coronário e em outra situação, utilizou-se polpas individuais removidas após a extração dentária. Para os testes de extração proteica, inicialmente o conteúdo pulpar foi liofilizado e pesado em balança de precisão. Após, foram utilizados os seguintes protocolos: 1. solução de lise (20 mM Tris-HCl pH 8,3, 1,5 mM KCl, 10 mM DTT, 1 mM PMSF 0,1%), por 30 min foi empregado (15); 2. maceração do conteúdo pulpar em nitrogênio líquido e deposição do conteúdo em solução de lise anteriormente relatada (140); 3. sonicação da amostra em solução tampão Tris-HCL ph 8,3 (141); e 4. utilização de bicarbonato de amônio 50 mM com choque térmico e a utilização de ácido cacodílico 10mM (142). Em seguida, todas as amostras testes foram quantificadas pelo método de Bradford (136).

Após a realização dos testes, optou-se pela técnica de extração com adição de solução de lise e sonicação durante 10 min, realizada em 10 ciclos, de 1 min, alternada com repouso de 1 minuto (15). Essa técnica foi escolhida uma vez que permitiu a extração de uma maior quantidade de proteínas, tanto em amostras derivadas de acesso coronário endodôntico, quanto de dentes extraídos. Após a quantificação, observou-se que amostras pulpares obtidas após acesso endodôntico, apresentavam uma quantificação proteica muito pequena, tanto para análise em LC-MS/MS, quanto nanoUPLC-MS<sup>E</sup>. Assim, todas as amostras de polpa foram derivadas de dentes extraídos.

Após a extração proteica, as mesmas foram encaminhadas para identificação proteica por LC-MS/MS. No entanto, devido a quantidade de proteínas identificadas ser muito pequena, este método foi descartado, fazendo-se necessário a utilização da metodologia nanoUPLC-MS<sup>E</sup>. Esta última, requer uma menor concentração de amostra para permitir suas identificações proteicas (15). Em adição, esta técnica permite a quantificação, identificação e caracterização de proteínas e peptídeos pouco abundantes (15). No entanto, mesmo com a utilização desse equipamento a identificação de proteínas utilizando uma única polpa dentária, não foi suficiente para identificação proteica satisfatória. Desta forma, a realização de um *pool* foi necessária, assim como relatado em estudos prévios de proteômica pulpar (11, 12, 14, 77).

Afim de identificar as proteínas de maneira mais fiel possível foram utilizados 3 *pools* para cada diagnóstico pulpar, contendo 5 dentes em cada, totalizando 15 dentes para cada tipo amostral. No entanto, a aquisição das amostras de dentes com pulpíte pode ser algo bastante difícil, uma vez que a maior parte dos dentes com esse diagnóstico ainda há possibilidade de reabilitação, não justificando sua extração dentária. Em adição, após a análise em nanoUPLC-MS<sup>E</sup>, verificou-se que um dos *pools* com diagnóstico de pulpíte irreversível não apresentou o mesmo padrão das outras duas réplicas. Desta forma, essa réplica foi excluída e a análise deste diagnóstico clínico foi realizada com apenas duas réplicas biológicas, totalizando um número final de 10 dentes.

Desta forma, após análise qualitativa em nanoUPLC-MS<sup>E</sup>, das proteínas presente no *pool* de cada condição clínica, um total de 508 proteínas foram identificadas em todos os quadros clínicos. Destas proteínas, 293 foram encontradas nos casos de diagnóstico de normalidade pulpar, englobando-se as proteínas



exclusivas a este quadro e as comuns aos demais diagnósticos. Resultados quantitativos semelhantes a estes foram encontrados por Eckhardt et al. (11). Também foram encontradas 302 proteínas humanas no diagnóstico clínico de necrose, resultado superior ao encontrado por Provenzano et al. (12) utilizando nanoUPLC-MS/MS, que observaram apenas 139 proteínas humanas presentes em casos de dentes com periodontite apical assintomática, essas encontradas antes da realização do tratamento químico-mecânico do sistema de canais radiculares (SCR). Neste estudo Provenzano et al. (12) observaram que dentre as proteínas identificadas, as proteínas relacionadas ao sistema imune estavam em destaque, assim como demonstrado em nosso estudo, onde 14% das proteínas identificadas exclusivamente no quadro de necrose apresentavam função na resposta imune. Em relação as 276 proteínas encontradas no diagnóstico de pulpite irreversível, ainda não há estudos relatados sobre uma análise proteômica do tecido pulpar inflamado. Desta forma, o estudo em questão corresponde ao primeiro a demonstrar o mapa proteômico da polpa dentária humana com diagnóstico clínico de pulpite irreversível.

Em relação ao tecido pulpar normal, nota-se que uma vez completada a formação do dente, a polpa está totalmente rodeada por um ambiente mineralizado, com secreção contínua e lenta de dentina secundária fisiológica. Desta forma, o espaço ocupado pela polpa pode ser gradualmente reduzido ao longo dos anos. No entanto, uma comunicação através do forame apical entre a polpa e os tecidos periapicais continua sendo observada (17). Em nosso estudo, foram incluídos apenas dentes de pacientes adultos, com idade de 18 a 40 anos, para assegurar o fechamento do ápice radicular.

O tecido pulpar normal parece ser constituído por um tecido conjuntivo frouxo ricamente vascularizado e innervado (16, 17). Seus principais componentes correspondem aos odontoblastos e fibroblastos do estroma (18). Células mesenquimais indiferenciadas também podem ser encontradas, além de células relacionadas a resposta imune (19). Em adição, células como neutrófilos, células dendríticas e macrófagos podem ser encontradas (20). Com essa constituição, a polpa possui as funções formadora, nutritiva, defensiva e sensorial (2, 17, 27). De acordo com essas funções, clinicamente os cinco dentes utilizados em cada *pool*, no grupo de dentes normais (correspondendo no total de 3) apresentavam-se assintomáticos. Porém, com necessidade de exodontia, por indicações ortodônticas, traumatismos de

tecido mole ou ausência de antagonista (131, 133). Observou-se que dentes com polpas normais, costumam reagir a estímulos com resposta dolorosa de intensidade compatível com a excitação provocada (3). Assim, no teste de sensibilidade ao frio realizados anteriormente a exodontia, observou-se uma resposta de fraca a moderada, cessando quase imediatamente quando o estímulo foi removido, assim como relatado por estudos prévios (1, 3, 33). Os testes de palpação e percussão não causaram respostas dolorosas. E radiograficamente, observou-se uma cavidade pulpar normal e uma lâmina dura intacta, também como relatado em estudo prévio (33).

Um total de 75 proteínas foram observadas de forma exclusiva na polpa em condições de normalidade, desta forma, algumas proteínas foram destacadas de acordo com a sua função pulpar. Proteínas que constituem a estrutura do citoesqueleto, foram observadas, destacando-se as isoformas tubulina cadeia alfa 1B e fragmento tubulina cadeia beta 4A, além das proteínas cofilina e filamina. As tubulinas constituem o microtúbulo celular, que podem ser essenciais no transporte de componentes intracelulares e na própria divisão celular (143). A união da unidade de  $\alpha$ -tubulina e outra unidade de  $\beta$ -tubulina formam um heterodímero. Os dímeros de tubulina, através da hidrólise de moléculas de guanosina trifosfato (GTP), se polimerizam formando os microtúbulos (144). A presença de tubulina no tecido pulpar pode estar relacionada a manutenção da estrutura celular, assim como na renovação celular, observado a partir da função dos microtúbulos na divisão celular. Outra proteína também identificada, correspondeu a filamina A, essa proteína contribui para organização, função, estabilidade e sinalização da actina no citoesqueleto (145). Na polpa dentária, além de desempenhar tais funções, a filamina A também pode estar envolvida com a caracterização da forma dos fibroblastos (146).

Em relação as proteínas encontradas com função de transporte, destaca-se a presença da proteína e fragmento de ligação da vitamina D. Estudo realizado por Woo et al. (147) demonstram que essa proteína pode ser um fator importante na formação da dentina, visto que corresponde a uma proteína relacionada a deposição e mobilização de cálcio em tecidos mineralizados (147). A deficiência desse mineral pode gerar hipocalcificações dentinárias, erupções tardias e em casos mais graves dentinogênese imperfeita (147, 148). Além da função de homeostase mineral, a vitamina D também está sendo avaliada como um agente anti-inflamatório, com a

capacidade de estimular a presença de peptídeos antimicrobianos (149, 150). Desta forma, a presença da proteína encontrada pode contribuir para mineralização dentinária, podendo ser avaliada como um possível biomarcador de regeneração dentinária, ou também atuando como proteína de defesa no tecido pulpar.

De acordo com as funções pulpares apresentadas, a vascularização da polpa dentária acontece através da microcirculação, essa possui a função de suprir as células de oxigênio e nutrientes, bem como promover uma via de excreção de restos metabólicos teciduais (1, 3). No tecido pulpar, observou-se que a presença da proteína fator de crescimento de transformação induzida por proteína beta Ig h3, além de estar relacionada com as funções de crescimento, proliferação e/ou manutenção celular, também podem estar relacionado ao processo de angiogênese, possuindo um papel importante na formação do lumen dos vasos sanguíneos e capilares (151), fator importante para suprimento de oxigênio e nutriente celular (3). Em relação a inervação desse tecido, a proteína gama enolase, além de desempenhar função no metabolismo e vias de energia, também parece ser uma proteína expressa predominantemente em neurônios e células nervosas, podendo ser uma proteína envolvida na função de sensibilidade da polpa normal. Estudo envolvendo polpa de dentes natais também encontram a proteína gama enolase, relacionando a marcadores de células nervosas (152). Além dessa proteína, o fragmento SLIT ROBO Rho GTPase ativando proteína 2 e fragmento domínio 4 LIM da proteína 1 possuem funções na diferenciação de células nervosas, colaborando para a função sensitiva pulpar (153).

Para manutenção dos quadros de normalidade pulpar, proteínas relativas ao metabolismo e vias de energia devem estar em equilíbrio (2, 154). Na polpa normal, o processo metabólico e vias de energia podem ser importantes para manutenção celular, assim como no suprimento energético na divisão para renovação celular. Desta forma, observou-se a presença de várias proteínas relativas a essa função no tecido pulpar normal. Dentre elas, a proteína frutose bisfosfato aldolase C que corresponde a uma enzima chave no quarto passo da glicólise, bem como na via reversa da gliconeogênese (154). Também foram identificados o fragmento da proteína gama enolase e o piruvato kinase que participam do processo da glicólise e atuam na biossíntese de ATP (154, 155).

Como relatado, a polpa também possui funções defensivas, desta forma a presença de células do sistema imune podem ser observadas, principalmente células

dendríticas e macrófagos, mesmo em quadros de normalidade pulpar (23). Em nosso estudo, no tecido pulpar normal foram identificadas várias isoformas de imunoglobulinas e proteínas referente ao fator complemento B. É provável que estas proteínas participem na vigilância do tecido pulpar e contribuam para resposta imune frente a presença de microrganismos (11). Da mesma forma, Eckhardt et al. (11) relatam a presença dessas proteínas relacionadas a resposta imune em seu estudo e também relacionam essas proteínas como uma possível vigilância do tecido pulpar.

A divisão celular dentro da coroa da polpa adulta parece ser limitada, embora a renovação celular após a apoptose, provavelmente ocorra (17, 18). Com a finalidade de renovação celular, no tecido pulpar normal, foram identificadas as proteínas tetraspanina, fragmento de fator de crescimento de transformação induzida por proteína beta Ig h3 e fragmento de fibronectina. A proteína tetraspanina está presente amplamente em células epiteliais endoteliais e células fibroblásticas. Ela também regulamenta a migração celular, eventos de fusão e sinalização, assim como organiza membranas multimoleculares (156). Outra proteína identificada foi a fibronectina, que está envolvida na proliferação de fibroblastos e se liga a superfície celular de vários compostos, tais como colágeno, fibrina, heparina e actina (157). Além de sua função na proliferação celular, também está relacionada a eventos de adesão e manutenção da forma celular (157). Estudo utilizando polpa dentária de ratos em desenvolvimento demonstra que essa proteína está envolvida em diferentes estágios da formação dentária e que a sua integração com a proteína integrina  $\beta 1$  está relacionada na diferenciação de ameloblastos para formação do esmalte (158). Para que ocorram renovações celulares, o processo de apoptose na polpa normal deve ocorrer, assim, proteínas ligadas a esse processo foram encontradas em nosso estudo, correspondendo ao fragmento da subunidade do complexo ativador do proteasoma 3, ubiquitina carboxil terminal hidrolase 17 *like* proteína 1 e 3, fator 1 de alongamento alfa 2. A última proteína citada está relacionada a regulação do processo de apoptose através de stress celular (159).

Outras proteínas encontradas parecem estar relacionadas a ligação do íon cálcio. Alguns estudos demonstram a importância de proteínas relacionadas ao íon cálcio em possíveis participações relacionadas a regeneração do complexo dentinário (11, 14, 126). Proteínas identificadas em nosso estudo, como anexina, pertencem a família de fosfolipídios dependentes da ligação de cálcio na membrana (11). Essas

parecem desempenhar papel na sinalização de cálcio, tráfico de vesículas, divisão celular, regulação do processo celular e apoptose (160). Eckhardt et al. (11), relatam que a anexina 1, 2 e 5 podem ser observadas na polpa e dentina saudáveis, mas não no plasma, reforçando a possibilidade do envolvimento dessas proteínas em possíveis processos regenerativos envolvidos no complexo dentino-pulpar. Outra proteína identificada foi a calnexina, que promove a ligação ao cálcio, interagindo com glicoproteínas recentemente sintetizadas no retículo endoplasmático (161). A calnexina pode atuar de forma auxiliar na montagem de proteínas e/ou na retenção dentro de subunidades do retículo endoplasmático (161). O fragmento caderina *like* da proteína 26A também identificado, corresponde a glicoproteína transmembranar que medeia a adesão célula-célula dependente de cálcio (162). A integração da informação recebida da sinalização célula-célula, pode determinar o comportamento celular final, podendo ocasionar a liberação de cálcio (162). Desta forma, essas proteínas possuem importante papel relacionado a calcificação tecidual, que na polpa normal, pode ser correlacionada a formação dentinária.

O presente estudo identificou a presença de 4 proteínas envolvidas na atividade de remodelação tecidual e/ou formação de tecido ósseo. Correspondendo as proteínas fragmento de biglican, periostina, glicoproteína alfa 2 e fibrilina 2. A glicoproteína alfa 2 corresponde a uma proteína plasmática relatada para desempenhar papéis na mineralização óssea e na resposta imune (163). Além disso, a glicoproteína alfa 2 está relacionada a processos patológicos de calcificação vascular (164). Estudo realizado demonstra que a biglicana está diretamente ligada a mineralização óssea, através da sua interação com minerais de fosfato de cálcio (165). Além de sua função na mineralização óssea, também promove, controla e regula o crescimento e mineralização durante a dentinogênese (124). Outro estudo demonstrou a necessidade da presença de biglican para a formação adequada de vasos sanguíneos durante cicatrização de fraturas (166). Por último, a proteína periostina também foi identificada; ela possui a capacidade de acelerar a cicatrização óssea (167). As proteínas glicoproteína alfa 2 e periostina ainda não foram observadas em estudos prévios de proteômica pulpar. Observando a função das mesmas relatadas no banco de dados, acredita-se que estas proteínas podem estar relacionadas a região do ápice na polpa normal, podendo contribuir para possíveis

quadros de remodelação na porção óssea. O envolvimento de algumas proteínas que desempenham funções na polpa normal pode ser avaliadas na figura 10.

Quando ocorre um processo de agressão pulpar, ocasionada principalmente por bactérias da cárie, alguns eventos imuno-inflamatórios podem acontecer (6). Tais eventos correspondem inicialmente ao aumento da vasculatura, permitindo uma maior migração de células de defesa para o local da invasão (168, 169). Concomitante, uma resposta reparadora simultaneamente poderá ser iniciada, com a presença de angiogênese na implantação de componentes da matriz dentinária (169). No entanto, caso o estímulo agressor persista, a resposta reparadora pode ser cessada pela morte dos odontoblastos e aumento das células de defesa para o local, gerando um processo inflamatório intenso delineado pela resposta imune adaptativa (6, 40). Tais eventos ocorrem no quadro de pulpíte irreversível. Neste quadro clínico, pode-se observar a presença de dor exacerbada intermitente ou contínua e em testes de sensibilidade ao frio, percebe-se dor intensa. Tais características foram observadas nos dentes selecionados para o diagnóstico de pulpíte irreversível utilizados neste estudo.

No quadro clínico de pulpíte irreversível, observou-se a presença de duas proteínas relacionadas a diferenciação de células nervosas. Estudos demonstram que aumentos significativos da inervação e liberação de neuropeptídeos pulpar ocorrem após danos teciduais (29, 30). Desta forma, o sintoma de dor aguda, pode-se dar em consequência aos maiores níveis de proteínas e biomoléculas responsáveis na diferenciação de células nervosas, podendo ser relacionadas a proteína 14 3 3 gama e proteína relacionada à di-hidropirimidase 2.

Acompanhada ao processo de dor, percebe-se que a reparação pode ser um evento dinâmico, no qual ocorre uma tentativa de regeneração dentinária em dada localidade, porém em outra, essa possibilidade pode ter cessado, devido a degradação dos odontoblastos e aumento da inflamação (2). Desta forma, proteínas relacionadas ao íon cálcio ainda foram encontradas, como a subunidade solúvel alfa 3 da guanilato ciclase e o fragmento de subunidade da anexina. Além dessas, a proteína asporina pode desempenhar papel na mineralização de vários tecidos. Quando expressa no ligamento periodontal, a proteína asporina se liga ao cálcio e promove a mineralização do colágeno osteoblástico (165). No entanto, asporina também pode ser uma proteína avaliada na polpa e na dentina, podendo ser

relacionada com a diferenciação de odontoblastos e mineralização da pré-dentina, como demonstrado por Lee et al. (170).

A atividade antimicrobiana pulpar pode resultar na liberação de moléculas que, além de tentar combater a infecção bacteriana podem, causar danos colaterais significativos ao tecido do hospedeiro (2). Como observado no estudo, o aumento da colonização bacteriana na porção pulpar, pode desencadear a presença de várias proteínas relacionadas ao stress celular, no quadro de pulpíte irreversível. Proteínas como, fragmento da proteína 3 contendo domínio de tioredoxin, tioredoxina dependente peróxido redutase mitocondrial e domínio 3 da tioredoxina. Acompanhada ao stress celular, o processo apoptótico também foi observado. Proteínas como alfa actinina 3, fragmento de clusterina, proteína fosfatase 1 contendo repetição rica em leucina de domínio PH e fragmento da proteína Ras relacionada a Rab 2A foram proteínas identificadas, que podem estar relacionadas ao processo de apoptose. Estudo demonstra que a glicoproteína clusterina medeia a apoptose através da interação com Bcl-XL terminal C (171).

Como relatado anteriormente, para que as células do sistema imune desempenhem seu papel no local acometido, uma ação de quimiotaxia e de diapedese ocorrem (2). Relacionada a atividade de quimiotaxia, observou-se a presença da proteína secretogranina 2, que atua através da via de transdução de sinal específica de ativação de fosfolipase D e fosfatidilinositol-3-quinase (172). Além disso, a secretogranina pode estar envolvida diretamente na angiogênese (92), fator importante relacionado a tentativa de reparo (169). Outra proteína importante na migração leucocitária, corresponde a proteína identificada no tecido pulpar com pulpíte irreversível, peptidil prolil cis trans isomerase. Essa proteína está presente no citoplasma de neutrófilos e pode orientar e iniciar a atividade de TNF- $\alpha$  na resposta inflamatória (173). Em resposta a invasão bactéria, o processo imune envolvido para eliminação do patógeno pode ser considerado complexo, pois durante a invasão bacteriana, respostas imune inata e adaptativa podem acontecer de forma concomitante (6). A proteína S100B por exemplo, mesmo sendo uma proteína mais relatada em casos de resposta imune inata, também foi identificada no tecido com pulpíte irreversível, o qual pode ser mediada predominantemente por uma resposta imune adaptativa. No entanto, ainda não se observa a presença de relatos da presença da proteína S100B na resposta inata do tecido pulpar. Estudo relatando a

super-expressão da proteína em infecções em células epiteliais da córnea, demonstrando seu envolvimento na resposta inata (174). Ainda em relação a polpa inflamada, também se identificou a proteína S100B que está relacionada às células nervosas. Assim, investiga-se a possibilidade da expressão dessa proteína estar relacionada com a sensibilidade dolorosa (175).

Com a contínua progressão das bactérias para interior pulpar e o aumento de células de defesa, a resposta imune adaptativa humoral e celular podem ser observadas (6). As principais células encontradas envolvidas na resposta adaptativa correspondem aos linfócitos, que sofrem influência da proteína fosfatase 1 contendo repetição rica em leucina de domínio PH (176). Esta proteína apesar de desenvolver funções relacionadas a apoptose celular, também parece ser importante no desenvolvimento e funções de células Treg (176). Nota-se que apesar da proteína anexina desempenhar função no reparo, replicação e regulação de DNA, ela também desenvolve funções na resposta imune (177). Uma série de funções podem ser atribuídas a essa proteína, tanto na resposta imune inata, quanto adaptativa. A anexina pode contribuir para a resposta imune adaptativa através do aumento das cascatas de sinalização que podem ser desencadeadas pela ativação de células T, além de regular a diferenciação e proliferação de células T ativadas (177). Além disso, anexina também promove a diferenciação de células Th1 e regula negativamente a diferenciação em células Th2 (177).

Assim como em outros quadros inflamatórios do corpo humano, após um quadro inflamatório, um processo de reparo pode ser iniciado (2). Mesmo não ocorrendo um reparo eficiente na pulpíte irreversível, percebe-se que proteínas com essa função foram identificadas. Como exemplo a proteína zeta delta 14 3 3, pode estar associada a ativação plaquetária. A presença de fibrinogênio gama encontrado nesse grupo, pode ser o principal local de interação com o receptor plaquetário, colaborando para a coagulação sanguínea (178). Outra proteína também identificada nesse processo foi a vitronectina, que através de sua ligação a integrina, promove ativação plaquetária (179). Reação que pode propiciar uma hemostasia tecidual.

Observou-se que partindo do quadro de polpa normal para o quadro de pulpíte irreversível, um aumento na identificação de proteínas relacionadas ao metabolismo e vias de energia, apoptose, reparo, replicação e regulação de DNA foi identificado. Outro ponto observado nesta transição de quadros pulpares foi o aumento na



diversidade de proteínas relacionadas a resposta imune. Fato, provavelmente relacionado ao processo patogênico da doença (33). Nesta resposta, as células requerem uma maior carga energética para as tentativas de destruição do patógeno (180), o que pode ter levado a observação do aumento no número de identificações das proteínas relacionadas ao metabolismo e vias de energia. Durante a tentativa de exterminação dos patógenos, além das mortes microbianas, muitas células do hospedeiro também acabam sofrendo apoptose (55). Fato também observado neste trabalho, com aumento na identificação de proteínas com esta função, neste quadro clínico. Com o desenvolvimento de uma resposta adaptativa na pulpíte irreversível, várias vias podem ser ativadas, necessitando dessa forma, de uma maior gama de biomoléculas relacionadas a resposta imune (6). Fato que motivou o aumento na diversidade proteica relacionada a resposta imune nesse diagnóstico. As proteínas descritas com funções relativas ao quadro de pulpíte irreversível podem ser avaliadas na figura 10.

Em relação as proteínas encontradas de forma semelhante no quadro de polpa normal e pulpíte irreversível, percebe-se que a maior identificação conta com a presença de proteínas relacionadas a constituição estrutural do citoesqueleto. Entre elas, três subtipos de filaminas foram encontradas estando relacionadas a união da actina (outra proteína identificada no grupo) e microfilamentos, além de regular a reorganização do citoesqueleto (181). Também observou-se a identificação de um tipo de tubulina, representada pelo subtipo 2A. Estas promovem a união das tubulina alfa e beta para formar os protofilamentos e posteriormente, formar os microtúbulos do citoesqueleto (11).

Devido a persistência e proliferação dos microrganismos na cavidade pulpar, produtos gerados por bactérias podem estimular as células imunes a produzir uma resposta inflamatória intensa (53). As proteínas responsáveis pelo metabolismo e vias de energia sofrem degradação, podendo levar a um desequilíbrio celular, ocasionando a ativação de lisossomos celulares ocasionando um processo de autólise (180). Desta forma, o processo de necrose pulpar parece ser instalado. Esse processo tem sua migração no sentido apical, podendo gradualmente atingir integralmente a polpa (48). Após a necrose pulpar, a infecção pode evoluir para região periapical. No início, esse processo pode desencadear uma reação inflamatória não específica seguida por uma resposta imune específica, bem como destruição óssea na área periapical (33).

Assim, nos dentes com diagnóstico de necrose pulpar, percebe-se no estudo a identificação de proteínas envolvidas com o processo de apoptose. Nesse processo, a morte celular pode ser caracterizada pelo encolhimento celular, picnose, condensação da cromatina e fragmentação genômica (182). Observou-se nessa condição que as células em processo de apoptose para evitar a fuga de enzimas proteolíticas, DNA e lipídios oxidados condensam a cromatina, diminuem seu tamanho e os conteúdos celulares podem ser selados dentro da célula através da reticulação de proteínas da membrana (182). Proteínas como o fragmento da família pleckstrina com domínio B membro 3, o fragmento de ATPase transicional do retículo endoplasmático e o fator de alongação alfa 1 foram proteínas identificadas no presente estudo, e previamente relacionadas ao processo de apoptose (159, 183). Sendo a última, relacionada a regulação da apoptose, induzida pelo stress celular (159). O processo de necrose pode ser caracterizado pela presença de alterações na membrana plasmática, com presença de poros, alterações mitocondriais e alterações nucleares (180). Neste processo, os produtos tóxicos liberados pelas células podem ocasionar lesões de organelas citoplasmáticas, incluindo as mitocôndrias e um colapso na homeostase celular é desenvolvido (180). Desta forma, ocorre a lise celular e liberação do seu conteúdo, podendo atingir outras células, levando a stress celular e envolvimento de células vizinhas no processo de necrose (182).

Proteínas relacionadas ao stress celular foram fortemente identificadas nesse diagnóstico, como a proteína *heat shock* 70 kDa e 71 kDa, caracterizadas por atuarem como proteínas chaperona, facilitando a dobragem adequada de proteínas recentemente traduzidas e mal dobradas, assim como estabilizando ou degradando as proteínas mutantes (89). Além disso, tal proteína também pode se ligar ao LPS e mediar a resposta inflamatória induzida pelo LPS, incluindo a secreção de TNF pelos monócitos (65). Em adição, elas também podem participar na via de controle de qualidade associada a ER-associada, em conjunto com co-chaperonas contendo domínio J e a ligase E3, sendo que a última proteína citada também foi identificada no estudo (184).

Apesar do quadro de apoptose ser um evento encontrado no quadro de necrose, essa condição clínica demonstrou um maior número de proteínas envolvidas com eventos de autofagia. O processo de autofagia corresponde ao evento catabólico celular que dá origem à degradação de componentes da própria célula, através dos

seus lisossomos (185). Com esta função biológica, este estudo identificou o fragmento decorin. Esta proteína se liga a múltiplos receptores de superfície celular, direcionando seu papel na supressão tumoral, induzindo um efeito estimulador na autofagia (186). Além disso, decorin também promove um efeito inibidor na angiogênese (186). Outra proteína identificada em nosso estudo foi a translocon associada a subunidade alfa, proteína que está envolvida na degradação do retículo endoplasmático (187). Proteínas como: alfa actinina 2, receptor de quinase de proteína 1 C ativada, transcetolase e fragmento do receptor de ativação da proteína quinase 1C, também, foram observadas neste estudo, relacionadas ao processo de autofagia, como descrito em estudos prévios (187-189).

O segundo maior percentual de proteínas identificadas no quadro clínico de necrose correspondeu a função relacionada a resposta imune. Neste sentido, em detrimento a uma maior colonização microbiana nos SCR, produtos bacterianos como LPS induzem a quimiotaxia (34). A persistência da agressão bacteriana não eliminada por mecanismos de defesa inata, induzirá um processo de cronificação (55). Produtos bacterianos podem ser transferidos para os tecidos perirradiculares e atuar estimulando o desenvolvimento de reações imunes do hospedeiro (8, 33). Esta reação, no entanto, apesar de ter a intenção de defesa do hospedeiro contra a infecção, também causa grave destruição tecidual (50).

Dentre vários mediadores inflamatórios, a citocina IL-3 pode atuar na hematopoese controlando a diferenciação, produção e função de granulócitos e macrófagos (190). Desta forma, o fragmento do receptor interleucina 3 alfa identificado no presente estudo possuem características relacionadas as funções de células do sistema imune. Devido a presença de células de defesa no SCR, proteínas relacionadas a apresentação de antígeno para células do sistema imune também foram identificadas neste estudo, como o fragmento de HLA classe I antígeno de histocompatibilidade B 46 cadeia alfa e a proteína HLA classe I antígeno de histocompatibilidade B 13 cadeia alfa. Uma ampla gama de imunoglobulinas também foram identificadas no presente estudo, correspondendo a Ig gama cadeia 3 região C, Ig cadeia V III região TEI, Ig lambda cadeia V, fragmento Ig alfa 2, Ig lambda cadeia V e Ig cadeia V, resultados semelhantes ao encontrado por Provenzano et al. (12). Essas glicoproteínas atuam na fase de reconhecimento da imunidade humoral, podendo estar ligadas a membrana celular ou liberadas por linfócitos (191). As

imunoglobulinas ligadas à membrana servem como receptores que, após ligação de um antígeno específico, desencadeiam a expansão clonal e a diferenciação dos linfócitos B em células plasmáticas secretoras de imunoglobulinas (192). As imunoglobulinas segregadas medeiam a fase efetora da imunidade humoral, o que pode resultar na eliminação de antígenos ligados (191). As proteínas restritas aos linfócitos também foram identificadas no presente estudo, tal como o fragmento de proteína de membrana restrita linfóide e a própria proteína de membrana restrita linfóide. Estas também foram avaliadas no estudo de Tedoldi et al. (193), que observaram a presença destas proteínas principalmente em linfócitos B, estando em baixos níveis em células T. Provavelmente relacionada a tentativa de eliminação bacteriana, foi identificado neste estudo a proteína de reconhecimento de peptidoglicano 1. Esta proteína possui atividade bactericida em direção as bactérias Gram-positivas, provocando a lise dessas bactérias através da intervenção na biossíntese do peptidoglicano (194). No entanto, a proteína de reconhecimento de peptidoglicano 1 também pode-se ligar a bactérias Gram-negativas e atuar na atividade bacteriostática (194). Outra proteína identificada em nosso estudo foi o fragmento de molécula 1 de adesão celular. Esta proteína pode mediar a adesão célula-célula, interagir com a molécula CRTAM e promover a citotoxicidade das células NK e na secreção de IFN- $\gamma$  por células CD8<sup>+</sup> (195, 196). Nos quadros de necrose pulpar, uma maior quantidade de células de defesa já foi observada em vários trabalhos (6, 8). Desta forma, provavelmente as proteínas identificadas neste estudo relacionadas ao crescimento, proliferação e/ou manutenção celular podem estar relacionadas as células do sistema imune, que nesse quadro se encontram em maioria.

Devido ao desequilíbrio metabólico celular, danos as membranas mitocondriais podem ocorrer e em consequência, processos relacionados a síntese energética ficam prejudicados, levando a perda de funções celulares dependentes de energia (197). É provável que este fato seja a justificativa para a diminuição do número de identificações proteicas relacionadas ao metabolismo e vias de energia, quando comparado com o quadro clínico de pulpíte irreversível. Ainda comparando-se o quadro de necrose com o quadro de pulpíte irreversível, percebeu-se uma maior identificação proteica relacionada a resposta ao stress. Fato este que pode estar relacionado ao quadro de apoptose, assim como os quadros de regulação da

proliferação e da autofagia (63). Percebe-se com esses resultados que no quadro de necrose pulpar não são observadas apenas paredes dentinárias repletas de biofilme e uma resposta imune tentando a eliminação microbiana (50). Este estudo pode reafirmar o que Ricucci e Siqueira (48) observaram, a presença de tecido inflamado em quadros de necrose pulpar (48). Em adição, estudos em modelos animais também relataram que a periodontite apical pode se desenvolver mesmo antes do tecido pulpar se tornar completamente necrótico (49). Esses estudos podem auxiliar na compreensão da razão para identificação de proteínas relacionadas ao metabolismo de proteínas, transporte, comunicação celular, reparo de DNA e proteínas estruturais do citoesqueleto, nos processos de necrose.

No diagnóstico clínico de necrose pulpar já não foram observadas proteínas envolvidas na diferenciação de células nervosas e remodelação tecidual e/ou formação de tecido ósseo. Este fato pode ser facilmente compreensível uma vez que durante a seleção dos elementos dentais para compor este grupo, apenas dentes com necrose pulpar e lesão periapical visível radiograficamente foram inclusos. Neste quadro clínico, foram incluídos apenas os dentes com ausência de sintomatologia dolorosa em resposta aos testes de sensibilidade pulpar, como descrito em estudos prévios (1, 27, 134, 198).

Com o processo de reabsorção óssea periapical, observou-se o recrutamento de células multinucleadas pela ação das citocinas CSF-1 e pelo RANKL (61). Neste processo de reabsorção óssea, células da resposta imune como linfócitos T, B e macrófagos constituem a maior parte do infiltrado inflamatório. Desta forma, linfócitos T parecem estar em maior número, na fase crônica da doença (62), processo pelo qual novamente as proteínas relacionadas a resposta imune aqui identificadas, podem estar envolvidas. Proteínas relacionadas ao processo de necrose podem ser visualizadas na figura 10.

Em relação as proteínas encontradas de forma comum nos diagnósticos de polpa normal e necrose, apenas 37 proteínas foram encontradas, podendo demonstrar a heterogeneidade dos tecidos avaliados. Estas foram representados em sua maioria por imunoglobulinas. Porém, pode-se perceber que essas proteínas podem possuir diferentes funções nas duas situações clínicas. Na polpa normal, as imunoglobulinas atuam na vigilância do tecido (11), enquanto na polpa necrótica, atuam ativamente contra patógenos invasores do tecido pulpar (12, 35). Proteínas

relacionadas a constituição estrutural do citoesqueleto também foram identificadas, podendo estar relacionadas a constituição normal das células pulpares (11).

Quando avaliou-se as proteínas identificadas em comum entre os quadros de pulpíte irreversível e necrose, observou-se a presença de 36 proteínas, sendo a maioria relacionadas a resposta imune. Percebe-se várias isoformas de fibrinogênio, proteína clivada pela trombina para produzir monômeros que, juntamente com o fibrinogênio beta e fibrinogênio gama, polimerizam para formar uma matriz de fibrina insolúvel (199) A fibrina apresenta função importante na hemostasia como um dos componentes primários do coágulo sanguíneo (199). Observou-se que o fibrinogênio pode atuar no quadro de pulpíte tentando recuperar o tecido e do mesmo modo, pode atuar em restos de tecido inflamado, no quadro de necrose (48). Duas isoformas de defensinas neutrofílicas também foram identificadas tanto nos quadros de pulpíte, quanto nos quadros de necrose. Esta proteína desempenha papel na lise bacteriana, através da permeabilização da membrana plasmática (200, 201).

Em relação as proteínas identificadas em comum a todos os diagnósticos, observou-se uma variada identificação de proteínas relacionadas a constituição estrutural do citoesqueleto, representadas por várias isoformas de tubulinas, filaminas e actinas citoplasmáticas. Também foram identificadas proteínas relacionadas a ligação do íon cálcio, que podem participar de diferentes modos em cada diagnóstico pulpar, como a anexina que pode desempenhar papel na sinalização de cálcio, tráfico de vesículas, divisão celular, regulação do processo celular e apoptose (160). Outro ponto presente, nos 3 diagnósticos analisados, consistiu na presença de proteínas relacionadas a resposta imune, observando-se principalmente a presença de algum tipo de imunoglobulina (11, 12).

Observando-se as proteínas identificadas e funções atribuídas, percebe-se que a análise do mapa proteico pulpar em polpa normal, pulpíte e necrose pode ser um instrumento valioso em estudos futuros relacionados a regeneração e engenharia tecidual pulpar. Proteínas identificadas em nosso estudo podem colaborar para o avanço de técnicas e tecnologias odontológicas. Além disso, nosso estudo pode fornecer informações a respeito da patogênese pulpar, importante para o desenvolvimento de novas terapias endodônticas. Podendo assim, levar informações para o desenvolvimento de procedimentos menos invasivos e com maior envolvimento de terapias biológicas.

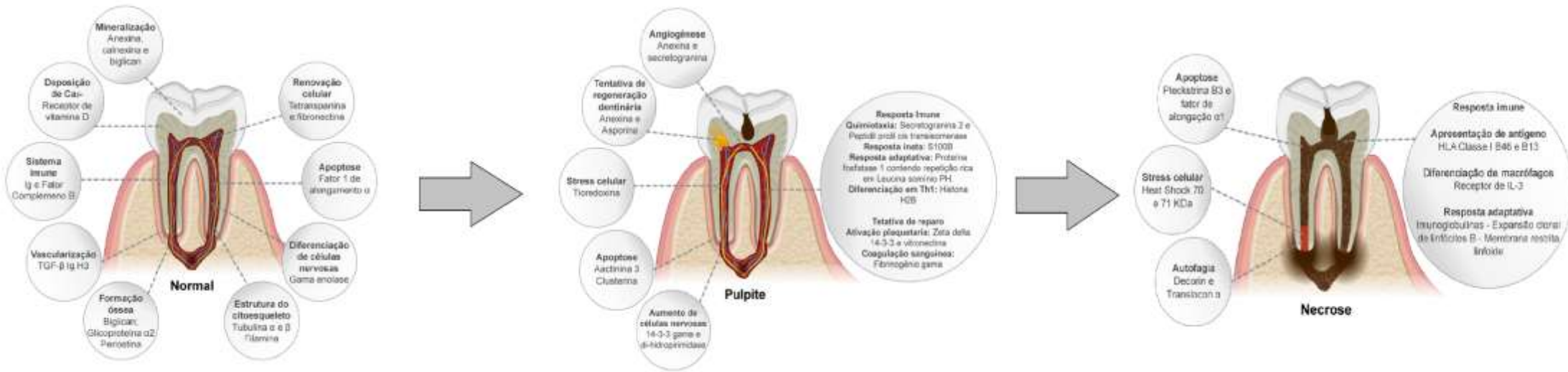


Figura 10 – Representação de proteínas envolvidas em eventos característicos da polpa normal, pulpite irreversível e necrose com lesão periapical visível radiograficamente.

## 7 CONCLUSÕES

- Uma mudança no perfil de proteínas relacionadas ao processo imune foi observada, conforme ocorre o agravamento da doença.
- Proteínas identificadas relacionadas a resposta imune no diagnóstico de pulpíte irreversível podem ser importantes na compreensão do processo inflamatório pulpar. Proteínas como: zeta delta 14 3 3, secretogranina 2, proteína S100 B, fibrinogênio gama e vitronectina podem ser importantes proteínas na compressão da patologia de pulpíte irreversível.
- Proteínas relacionadas ao transporte, constituição estrutural do citoesqueleto, metabolismo e vias de energias foram as mais identificadas em polpas normais.
- Proteínas relacionadas a resposta imune, apoptose e metabolismo de proteínas foram as mais identificadas em pulpíte irreversível.
- Proteínas relacionadas as funções de constituição estrutural do citoesqueleto, resposta imune, transporte, resposta ao stress, regulação de proliferação celular e autofagia foram as mais identificadas em necrose pulpar.
- Proteínas relacionadas a resposta imune no quadro de necrose pulpar pode levar a compreensão dos eventos observados na destruição tecidual. Proteínas como: receptor interleucina 3 alfa, proteína HLA classe I antígeno de histocompatibilidade B 13 cadeia alfa e proteína de membrana restrita linfoide podem estar envolvidas no processo de lesões periapicais.
- A maior parte das proteínas identificadas de forma comum aos diferentes quadros clínicos analisados foram relacionadas a constituição estrutural do citoesqueleto.



## 8 REFERÊNCIAS

1. Abbott PV, Yu C. A clinical classification of the status of the pulp and the root canal system. *Aust Dent J.* 2007;52(1 Suppl):S17-31.
2. Farges JC, Alliot-Licht B, Renard E, Ducret M, Gaudin A, Smith AJ, et al. Dental Pulp Defence and Repair Mechanisms in Dental Caries. *Mediators Inflamm.* 2015;2015:230251.
3. Yu C, Abbott PV. An overview of the dental pulp: its functions and responses to injury. *Aust Dent J.* 2007;52(1 Suppl):S4-16.
4. Bender IB. Reversible and irreversible painful pulpitis: diagnosis and treatment. *Aust Endod J.* 2000;26(1):10-4.
5. Hahn CL, Liewehr FR. Innate immune responses of the dental pulp to caries. *J Endod.* 2007;33(6):643-51.
6. Hahn CL, Liewehr FR. Update on the adaptive immune responses of the dental pulp. *J Endod.* 2007;33(7):773-81.
7. Mejare IA, Axelsson S, Davidson T, Frisk F, Hakeberg M, Kvist T, et al. Diagnosis of the condition of the dental pulp: a systematic review. *Int Endod J.* 2012;45(7):597-613.
8. Nair PN. Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2004;15(6):348-81.
9. Freire MS, Cantuaria AP, Lima SM, Almeida JA, Murad AM, Franco OL, et al. NanoUPLC-MS(E) proteomic analysis of osteoclastogenesis downregulation by IL-4. *J Proteomics.* 2016;131:8-16.
10. Jakovljevic A, Knezevic A, Karalic D, Soldatovic I, Popovic B, Milasin J, et al. Pro-inflammatory cytokine levels in human apical periodontitis: Correlation with clinical and histological findings. *Aust Endod J.* 2015;41(2):72-7.
11. Eckhardt A, Jagr M, Pataridis S, Miksik I. Proteomic analysis of human tooth pulp: proteomics of human tooth. *J Endod.* 2014;40(12):1961-6.
12. Provenzano JC, Siqueira JF, Jr., Rocas IN, Domingues RR, Paes Leme AF, Silva MR. Metaproteome analysis of endodontic infections in association with different clinical conditions. *PLoS One.* 2013;8(10):e76108.
13. Belda-Ferre P, Williamson J, Simon-Soro A, Artacho A, Jensen ON, Mira A. The human oral metaproteome reveals potential biomarkers for caries disease. *Proteomics.* 2015;15(20):3497-507.
14. Eckhard U, Marino G, Abbey SR, Tharmarajah G, Matthew I, Overall CM. The Human Dental Pulp Proteome and N-Terminome: Levering the Unexplored Potential of Semitryptic Peptides Enriched by TAILS to Identify Missing Proteins in the Human Proteome Project in Underexplored Tissues. *J Proteome Res.* 2015;14(9):3568-82.
15. Murad AM, Rech EL. NanoUPLC-MSE proteomic data assessment of soybean seeds using the Uniprot database. *BMC Biotechnol.* 2012;12:82.
16. Kawashima N, Okiji T. Odontoblasts: Specialized hard-tissue-forming cells in the dentin-pulp complex. *Congenit Anom (Kyoto).* 2016;56(4):144-53.
17. Goldberg M, Smith AJ. Cells and Extracellular Matrices of Dentin and Pulp: A Biological Basis for Repair and Tissue Engineering. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2004;15(1):13-27.
18. Moule AJ, Li H, Bartold PM. Donor variability in the proliferation of human dental pulp fibroblasts. *Aust Dent J.* 1995;40(2):110-4.

19. Renard E, Gaudin A, Bienvenu G, Amiaud J, Farges JC, Cuturi MC, et al. Immune Cells and Molecular Networks in Experimentally Induced Pulpitis. *J Dent Res.* 2016;95(2):196-205.
20. Rechenberg DK, Galicia JC, Peters OA. Biological Markers for Pulpal Inflammation: A Systematic Review. *PLoS One.* 2016;11(11):e0167289.
21. Smith AJ, Lesot H. Induction and regulation of crown dentinogenesis: embryonic events as a template for dental tissue repair? *Crit Rev Oral Biol Med.* 2001;12(5):425-37.
22. Begue-Kirn C, Smith AJ, Lorient M, Kupferle C, Ruch JV, Lesot H. Comparative analysis of TGF beta s, BMPs, IGF1, msxs, fibronectin, osteonectin and bone sialoprotein gene expression during normal and in vitro-induced odontoblast differentiation. *Int J Dev Biol.* 1994;38(3):405-20.
23. Izumi T, Kobayashi I, Okamura K, Sakai H. Immunohistochemical study on the immunocompetent cells of the pulp in human non-carious and carious teeth. *Arch Oral Biol.* 1995;40(7):609-14.
24. Jontell M, Gunraj MN, Bergenholtz G. Immunocompetent cells in the normal dental pulp. *J Dent Res.* 1987;66(6):1149-53.
25. Farges JC, Carrouel F, Keller JF, Baudouin C, Msika P, Bleicher F, et al. Cytokine production by human odontoblast-like cells upon Toll-like receptor-2 engagement. *Immunobiology.* 2011;216(4):513-7.
26. Fristad I. Dental innervation: functions and plasticity after peripheral injury. *Acta Odontol Scand.* 1997;55(4):236-54.
27. Fristad I, Bletsa A, Byers M. Inflammatory nerve responses in the dental pulp. *Endodontic Topics.* 2010;17:12-41.
28. West NX, Lussi A, Seong J, Hellwig E. Dentin hypersensitivity: pain mechanisms and aetiology of exposed cervical dentin. *Clin Oral Investig.* 2013;17 Suppl 1:S9-19.
29. Byers MR, Taylor PE, Khayat BG, Kimberly CL. Effects of injury and inflammation on pulpal and periapical nerves. *J Endod.* 1990;16(2):78-84.
30. Bowles WR, Withrow JC, Lepinski AM, Hargreaves KM. Tissue levels of immunoreactive substance P are increased in patients with irreversible pulpitis. *J Endod.* 2003;29(4):265-7.
31. Beres F, Isaac J, Mouton L, Rouziere S, Berdal A, Simon S, et al. Comparative Physicochemical Analysis of Pulp Stone and Dentin. *J Endod.* 2016;42(3):432-8.
32. Young CS, Terada S, Vacanti JP, Honda M, Bartlett JD, Yelick PC. Tissue engineering of complex tooth structures on biodegradable polymer scaffolds. *J Dent Res.* 2002;81(10):695-700.
33. Lima SM, de Padua GM, Sousa MG, Freire Mde S, Franco OL, Rezende TM. Antimicrobial peptide-based treatment for endodontic infections--biotechnological innovation in endodontics. *Biotechnol Adv.* 2015;33(1):203-13.
34. Hahn CL, Best AM, Tew JG. Cytokine induction by *Streptococcus mutans* and pulpal pathogenesis. *Infect Immun.* 2000;68(12):6785-9.
35. Hahn CL, Best AM. The pulpal origin of immunoglobulins in dentin beneath caries: an immunohistochemical study. *J Endod.* 2006;32(3):178-82.
36. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.* 2004;25(12):677-86.
37. Bletsa A, Berggreen E, Fristad I, Tenstad O, Wiig H. Cytokine signalling in rat pulp interstitial fluid and transcapillary fluid exchange during lipopolysaccharide-induced acute inflammation. *J Physiol.* 2006;573(Pt 1):225-36.

38. Sato M, Sobhan U, Tsumura M, Kuroda H, Soya M, Masamura A, et al. Hypotonic-induced stretching of plasma membrane activates transient receptor potential vanilloid channels and sodium-calcium exchangers in mouse odontoblasts. *J Endod.* 2013;39(6):779-87.
39. Son AR, Yang YM, Hong JH, Lee SI, Shibukawa Y, Shin DM. Odontoblast TRP channels and thermo/mechanical transmission. *J Dent Res.* 2009;88(11):1014-9.
40. Barrington R, Zhang M, Fischer M, Carroll MC. The role of complement in inflammation and adaptive immunity. *Immunol Rev.* 2001;180:5-15.
41. Guglani L, Khader SA. Th17 cytokines in mucosal immunity and inflammation. *Curr Opin HIV AIDS.* 2010;5(2):120-7.
42. Yang S, Zhu L, Xiao L, Shen Y, Wang L, Peng B, et al. Imbalance of interleukin-17+ T-cell and Foxp3+ regulatory T-cell dynamics in rat periapical lesions. *J Endod.* 2014;40(1):56-62.
43. Pezelj-Ribaric S, Anic I, Brekalo I, Miletic I, Hasan M, Simunovic-Soskic M. Detection of tumor necrosis factor alpha in normal and inflamed human dental pulps. *Arch Med Res.* 2002;33(5):482-4.
44. He Y, Gan Y, Lu J, Feng Q, Wang H, Guan H, et al. Pulpal Tissue Inflammatory Reactions after Experimental Pulpal Exposure in Mice. *J Endod.* 2016.
45. Heyeraas KJ, Berggreen E. Interstitial fluid pressure in normal and inflamed pulp. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1999;10(3):328-36.
46. Leonardi DP GA, Almeida S, Schramm CA, Baratto-Filho F. Alterações pulpares e periapicais. *RSBO.* 2011;8(4):47-61.
47. Mudie AS, Holland GR. Local opioids in the inflamed dental pulp. *J Endod.* 2006;32(4):319-23.
48. Ricucci D, Siqueira JF, Jr., Loghin S, Lin LM. Pulp and apical tissue response to deep caries in immature teeth: A histologic and histobacteriologic study. *J Dent.* 2016.
49. Siqueira JF, Jr. Aetiology of root canal treatment failure: why well-treated teeth can fail. *Int Endod J.* 2001;34(1):1-10.
50. Siqueira JF, Jr., Rocas IN. Bacterial pathogenesis and mediators in apical periodontitis. *Braz Dent J.* 2007;18(4):267-80.
51. Stashenko P, Teles R, D'Souza R. Periapical inflammatory responses and their modulation. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1998;9(4):498-521.
52. Marton IJ, Kiss C. Protective and destructive immune reactions in apical periodontitis. *Oral Microbiol Immunol.* 2000;15(3):139-50.
53. Jacobi-Gresser E, Schutt S, Huesker K, Von Baehr V. Methyl mercaptan and hydrogen sulfide products stimulate proinflammatory cytokines in patients with necrotic pulp tissue and endodontically treated teeth. *J Biol Regul Homeost Agents.* 2015;29(1):73-84.
54. Rechenberg DK, Held U, Burgstaller JM, Bosch G, Attin T. Pain levels and typical symptoms of acute endodontic infections: a prospective, observational study. *BMC Oral Health.* 2016;16(1):61.
55. Nair PN. Apical periodontitis: a dynamic encounter between root canal infection and host response. *Periodontol 2000.* 1997;13:121-48.
56. Siqueira JF, Jr., Rocas IN. The microbiota of acute apical abscesses. *J Dent Res.* 2009;88(1):61-5.
57. Kovac J, Kovac D. [Histopathology and etiopathogenesis of chronic apical periodontitis--periapical granuloma]. *Epidemiol Mikrobiol Imunol.* 2011;60(2):77-86.
58. Siqueira JF, Jr. Endodontic infections: concepts, paradigms, and perspectives. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2002;94(3):281-93.

59. Henriques LC, de Brito LC, Tavares WL, Vieira LQ, Ribeiro Sobrinho AP. Cytokine analysis in lesions refractory to endodontic treatment. *J Endod.* 2011;37(12):1659-62.
60. Sato K, Suematsu A, Okamoto K, Yamaguchi A, Morishita Y, Kadono Y, et al. Th17 functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links T cell activation and bone destruction. *J Exp Med.* 2006;203(12):2673-82.
61. Fan X, Fan D, Gewant H, Royce CL, Nanes MS, Rubin J. Increasing membrane-bound MCSF does not enhance OPGL-driven osteoclastogenesis from marrow cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2001;280(1):E103-11.
62. Liapatas S, Nakou M, Rontogianni D. Inflammatory infiltrate of chronic periradicular lesions: an immunohistochemical study. *Int Endod J.* 2003;36(7):464-71.
63. Asea A. Stress proteins and initiation of immune response: chaperone activity of hsp72. *Exerc Immunol Rev.* 2005;11:34-45.
64. Todryk SM, Gough MJ, Pockley AG. Facets of heat shock protein 70 show immunotherapeutic potential. *Immunology.* 2003;110(1):1-9.
65. Pockley AG. Heat shock proteins as regulators of the immune response. *Lancet.* 2003;362(9382):469-76.
66. Tsiatsiani L, Heck AJ. Proteomics beyond trypsin. *FEBS J.* 2015;282(14):2612-26.
67. Bensimon A, Heck AJ, Aebersold R. Mass spectrometry-based proteomics and network biology. *Annu Rev Biochem.* 2012;81:379-405.
68. Altelaar AF, Munoz J, Heck AJ. Next-generation proteomics: towards an integrative view of proteome dynamics. *Nat Rev Genet.* 2013;14(1):35-48.
69. Walther TC, Mann M. Mass spectrometry-based proteomics in cell biology. *J Cell Biol.* 2010;190(4):491-500.
70. Zeng Y, Deng FY, Zhu W, Zhang L, He H, Xu C, et al. Mass spectrometry based proteomics profiling of human monocytes. *Protein Cell.* 2016.
71. Jou YJ, Lin CD, Lai CH, Chen CH, Kao JY, Chen SY, et al. Proteomic identification of salivary transferrin as a biomarker for early detection of oral cancer. *Anal Chim Acta.* 2010;681(1-2):41-8.
72. Cappello P, Principe M, Bulfamante S, Novelli F. Alpha-Enolase (ENO1), a potential target in novel immunotherapies. *Front Biosci (Landmark Ed).* 2017;22:944-59.
73. Gharbi M, Deberg M, Henrotin Y. Application for proteomic techniques in studying osteoarthritis: a review. *Front Physiol.* 2011;2:90.
74. Goncalves Lda R, Soares MR, Nogueira FC, Garcia C, Camisasca DR, Domont G, et al. Comparative proteomic analysis of whole saliva from chronic periodontitis patients. *J Proteomics.* 2010;73(7):1334-41.
75. Camisasca DR, da Ros Goncalves L, Soares MR, Sandim V, Nogueira FC, Garcia CH, et al. A proteomic approach to compare saliva from individuals with and without oral leukoplakia. *J Proteomics.* 2017;151:43-52.
76. Marouga R, David S, Hawkins E. The development of the DIGE system: 2D fluorescence difference gel analysis technology. *Anal Bioanal Chem.* 2005;382(3):669-78.
77. Jagr M, Eckhardt A, Pataridis S, Foltan R, Mysak J, Miksik I. Proteomic analysis of human tooth pulp proteomes - Comparison of caries-resistant and caries-susceptible persons. *J Proteomics.* 2016;145:127-36.
78. Park SK, Venable JD, Xu T, Yates JR, 3rd. A quantitative analysis software tool for mass spectrometry-based proteomics. *Nat Methods.* 2008;5(4):319-22.

79. Ishihama Y. Proteomic LC-MS systems using nanoscale liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2005;1067(1-2):73-83.
80. Tang N, Tornatore P, Weinberger SR. Current developments in SELDI affinity technology. *Mass Spectrom Rev*. 2004;23(1):34-44.
81. Vorderwülbecke S, Cleverley S, Weinberger SR, Wiesner A. Protein quantification by the SELDI-TOF-MS-based ProteinChip® System. *Nature Methods*. 2005;02:393-5.
82. Dommisch H, Vorderwulbecke S, Eberhard J, Steglich M, Jepsen S. SELDI-TOF-MS of gingival crevicular fluid--a methodological approach. *Arch Oral Biol*. 2009;54(9):803-9.
83. Shen Y, Zhao R, Berger SJ, Anderson GA, Rodriguez N, Smith RD. High-efficiency nanoscale liquid chromatography coupled on-line with mass spectrometry using nanoelectrospray ionization for proteomics. *Anal Chem*. 2002;74(16):4235-49.
84. Murad AM, Souza GH, Garcia JS, Rech EL. Detection and expression analysis of recombinant proteins in plant-derived complex mixtures using nanoUPLC-MS(E). *J Sep Sci*. 2011;34(19):2618-30.
85. Liu H, Finch JW, Lavalley MJ, Collamati RA, Benevides CC, Gebler JC. Effects of column length, particle size, gradient length and flow rate on peak capacity of nano-scale liquid chromatography for peptide separations. *J Chromatogr A*. 2007;1147(1):30-6.
86. Petriz BA, Almeida JA, Gomes CP, Pereira RW, Murad AM, Franco OL. NanoUPLC/MS(E) proteomic analysis reveals modulation on left ventricle proteome from hypertensive rats after exercise training. *J Proteomics*. 2015;113:351-65.
87. Billing AM, Ben Hamidane H, Dib SS, Cotton RJ, Bhagwat AM, Kumar P, et al. Comprehensive transcriptomic and proteomic characterization of human mesenchymal stem cells reveals source specific cellular markers. *Sci Rep*. 2016;6:21507.
88. Moseley P. Stress proteins and the immune response. *Immunopharmacology*. 2000;48(3):299-302.
89. De Maio A, Vazquez D. Extracellular heat shock proteins: a new location, a new function. *Shock*. 2013;40(4):239-46.
90. Nicholas D, Tang H, Zhang Q, Rudra J, Xu F, Langridge W, et al. Quantitative proteomics reveals a role for epigenetic reprogramming during human monocyte differentiation. *Mol Cell Proteomics*. 2015;14(1):15-29.
91. Deng FY, Zhu W, Zeng Y, Zhang JG, Yu N, Liu YZ, et al. Is GSN significant for hip BMD in female Caucasians? *Bone*. 2014;63:69-75.
92. Kogawa M, Findlay DM, Anderson PH, Ormsby R, Vincent C, Morris HA, et al. Osteoclastic metabolism of 25(OH)-vitamin D3: a potential mechanism for optimization of bone resorption. *Endocrinology*. 2010;151(10):4613-25.
93. Siqueira WL, Lee YH, Xiao Y, Held K, Wong W. Identification and characterization of histatin 1 salivary complexes by using mass spectrometry. *Proteomics*. 2012;12(22):3426-35.
94. Bazzichi L, Ciregia F, Giusti L, Baldini C, Giannaccini G, Giacomelli C, et al. Detection of potential markers of primary fibromyalgia syndrome in human saliva. *Proteomics Clin Appl*. 2009;3(11):1296-304.
95. Rezende TM, Lima SM, Petriz BA, Silva ON, Freire MS, Franco OL. Dentistry proteomics: from laboratory development to clinical practice. *J Cell Physiol*. 2013;228(12):2271-84.

96. Al-Tarawneh SK, Border MB, Dibble CF, Bencharit S. Defining salivary biomarkers using mass spectrometry-based proteomics: a systematic review. *OMICS*. 2011;15(6):353-61.
97. Gorg A, Weiss W, Dunn MJ. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics*. 2004;4(12):3665-85.
98. Ellias MF, Zainal Ariffin SH, Karsani SA, Abdul Rahman M, Senafi S, Megat Abdul Wahab R. Proteomic analysis of saliva identifies potential biomarkers for orthodontic tooth movement. *ScientificWorldJournal*. 2012;2012:647240.
99. Park ES, Cho HS, Kwon TG, Jang SN, Lee SH, An CH, et al. Proteomics analysis of human dentin reveals distinct protein expression profiles. *J Proteome Res*. 2009;8(3):1338-46.
100. Bostanci N, Heywood W, Mills K, Parkar M, Nibali L, Donos N. Application of label-free absolute quantitative proteomics in human gingival crevicular fluid by LC/MS E (gingival exudatome). *J Proteome Res*. 2010;9(5):2191-9.
101. Okano S, Shibata Y, Shiroza T, Abiko Y. Proteomics-based analysis of a counter-oxidative stress system in *Porphyromonas gingivalis*. *Proteomics*. 2006;6(1):251-8.
102. Lee YH, Zimmerman JN, Custodio W, Xiao Y, Basiri T, Hatibovic-Kofman S, et al. Proteomic evaluation of acquired enamel pellicle during in vivo formation. *PLoS One*. 2013;8(7):e67919.
103. Bostanci N, Bao K. Contribution of proteomics to our understanding of periodontal inflammation. *Proteomics*. 2016.
104. Puig-Silla M, Montiel-Company JM, Dasi-Fernandez F, Almerich-Silla JM. Prevalence of periodontal pathogens as predictor of the evolution of periodontal status. *Odontology*. 2016.
105. Pham TK, Roy S, Noirel J, Douglas I, Wright PC, Stafford GP. A quantitative proteomic analysis of biofilm adaptation by the periodontal pathogen *Tannerella forsythia*. *Proteomics*. 2010;10(17):3130-41.
106. Xia Q, Wang T, Taub F, Park Y, Capestany CA, Lamont RJ, et al. Quantitative proteomics of intracellular *Porphyromonas gingivalis*. *Proteomics*. 2007;7(23):4323-37.
107. Sztukowska M, Bugno M, Potempa J, Travis J, Kurtz DM, Jr. Role of rubrerythrin in the oxidative stress response of *Porphyromonas gingivalis*. *Mol Microbiol*. 2002;44(2):479-88.
108. Yoshida A, Niki M, Yamamoto Y, Yasunaga A, Ansai T. Proteome analysis identifies the Dpr protein of *Streptococcus mutans* as an important factor in the presence of early streptococcal colonizers of tooth surfaces. *PLoS One*. 2015;10(3):e0121176.
109. Martins C, Buczynski AK, Maia LC, Siqueira WL, Castro GF. Salivary proteins as a biomarker for dental caries--a systematic review. *J Dent*. 2013;41(1):2-8.
110. Zhang J, Zhou S, Zheng H, Zhou Y, Chen F, Lin J. Magnetic bead-based salivary peptidome profiling analysis during orthodontic treatment durations. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012;421(4):844-9.
111. Florez-Moreno GA, Marin-Restrepo LM, Isaza-Guzman DM, Tobon-Arroyave SI. Screening for salivary levels of deoxyypyridinoline and bone-specific alkaline phosphatase during orthodontic tooth movement: a pilot study. *Eur J Orthod*. 2013;35(3):361-8.
112. Ciavarella D, Mastrovincenzo M, D'Onofrio V, Chimenti C, Parziale V, Barbato E, et al. Saliva analysis by surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight

- mass spectrometry (SELDI-TOF-MS) in orthodontic treatment: first pilot study. *Prog Orthod*. 2011;12(2):126-31.
113. Chiappelli F, Covani U, Giacomelli L. Proteomics as it pertains to oral pathologies and dental research. *Bioinformation*. 2011;5(7):277.
114. Bosello S, Peluso G, Iavarone F, Tulusso B, Messina I, Faa G, et al. Thymosin beta4 and beta10 in Sjogren's syndrome: saliva proteomics and minor salivary glands expression. *Arthritis Res Ther*. 2016;18(1):229.
115. Delaleu N, Mydel P, Brun JG, Jonsson MV, Alimonti A, Jonsson R. Sjogren's syndrome patients with ectopic germinal centers present with a distinct salivary proteome. *Rheumatology (Oxford)*. 2016;55(6):1127-37.
116. Delaleu N, Mydel P, Kwee I, Brun JG, Jonsson MV, Jonsson R. High fidelity between saliva proteomics and the biologic state of salivary glands defines biomarker signatures for primary Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheumatol*. 2015;67(4):1084-95.
117. Deutsch O, Krief G, Konttinen YT, Zaks B, Wong DT, Aframian DJ, et al. Identification of Sjogren's syndrome oral fluid biomarker candidates following high-abundance protein depletion. *Rheumatology (Oxford)*. 2015;54(5):884-90.
118. Jou YJ, Lin CD, Lai CH, Tang CH, Huang SH, Tsai MH, et al. Salivary zinc finger protein 510 peptide as a novel biomarker for detection of oral squamous cell carcinoma in early stages. *Clin Chim Acta*. 2011;412(15-16):1357-65.
119. Jou YJ, Hua CH, Lin CD, Lai CH, Huang SH, Tsai MH, et al. S100A8 as potential salivary biomarker of oral squamous cell carcinoma using nanoLC-MS/MS. *Clin Chim Acta*. 2014;436:121-9.
120. Murakami M, Imabayashi K, Watanabe A, Takeuchi N, Ishizaka R, Iohara K, et al. Identification of novel function of vimentin for quality standard for regenerated pulp tissue. *J Endod*. 2012;38(7):920-6.
121. Ishiguro K, Yamashita K, Nakagaki H, Iwata K, Hayakawa T. Identification of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) in human teeth and its distribution in cementum and dentine. *Arch Oral Biol*. 1994;39(4):345-9.
122. Petersson U, Hulthenby K, Wendel M. Identification, distribution and expression of osteoadherin during tooth formation. *Eur J Oral Sci*. 2003;111(2):128-36.
123. Jagr M, Eckhardt A, Pataridis S, Broukal Z, Duskova J, Miksik I. Proteomics of human teeth and saliva. *Physiol Res*. 2014;63 Suppl 1:S141-54.
124. Mazzone A, Pashley DH, Tay FR, Gobbi P, Orsini G, Ruggeri A, Jr., et al. Immunohistochemical identification of MMP-2 and MMP-9 in human dentin: correlative FEI-SEM/TEM analysis. *J Biomed Mater Res A*. 2009;88(3):697-703.
125. Niu LN, Zhang L, Jiao K, Li F, Ding YX, Wang DY, et al. Localization of MMP-2, MMP-9, TIMP-1, and TIMP-2 in human coronal dentine. *J Dent*. 2011;39(8):536-42.
126. Jagr M, Eckhardt A, Pataridis S, Miksik I. Comprehensive proteomic analysis of human dentin. *Eur J Oral Sci*. 2012;120(4):259-68.
127. Ma D, Cui L, Gao J, Yan W, Liu Y, Xu S, et al. Proteomic analysis of mesenchymal stem cells from normal and deep carious dental pulp. *PLoS One*. 2014;9(5):e97026.
128. Akpınar G, Kasap M, Aksoy A, Duruksu G, Gacar G, Karaoz E. Phenotypic and proteomic characteristics of human dental pulp derived mesenchymal stem cells from a natal, an exfoliated deciduous, and an impacted third molar tooth. *Stem Cells Int*. 2014;2014:457059.
129. Nandakumar R, Madayiputhiya N, Fouad AF. Proteomic analysis of endodontic infections by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Oral Microbiol Immunol*. 2009;24(4):347-52.

130. Montandon A, Zuza E, Toledo BE. Prevalence and reasons for tooth loss in a sample from a dental clinic in Brazil. *Int J Dent*. 2012;2012:719750.
131. Costa MG, Pazzini CA, Pantuzo MC, Jorge ML, Marques LS. Is there justification for prophylactic extraction of third molars? A systematic review. *Braz Oral Res*. 2013;27(2):183-8.
132. Hupp JR. Legal implications of third molar removal. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am*. 2007;19(1):129-36, viii.
133. Lopes V, Mumenya R, Feinmann C, Harris M. Third molar surgery: an audit of the indications for surgery, post-operative complaints and patient satisfaction. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 1995;33(1):33-5.
134. Gopikrishna V, Pradeep G, Venkateshbabu N. Assessment of pulp vitality: a review. *Int J Paediatr Dent*. 2009;19(1):3-15.
135. Huang GT, Sonoyama W, Chen J, Park SH. In vitro characterization of human dental pulp cells: various isolation methods and culturing environments. *Cell Tissue Res*. 2006;324(2):225-36.
136. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72:248-54.
137. Shapiro HM. Technical developments in flow cytometry. *Hum Pathol*. 1986;17(7):649-51.
138. Geromanos SJ, Vissers JP, Silva JC, Dorschel CA, Li GZ, Gorenstein MV, et al. The detection, correlation, and comparison of peptide precursor and product ions from data independent LC-MS with data dependant LC-MS/MS. *Proteomics*. 2009;9(6):1683-95.
139. Li GZ, Vissers JP, Silva JC, Golick D, Gorenstein MV, Geromanos SJ. Database searching and accounting of multiplexed precursor and product ion spectra from the data independent analysis of simple and complex peptide mixtures. *Proteomics*. 2009;9(6):1696-719.
140. Reddy VS, Reddy AS. Proteomics of calcium-signaling components in plants. *Phytochemistry*. 2004;65(12):1745-76.
141. Doulah MS. Mechanism of disintegration of biological cells in ultrasonic cavitation. *Biotechnol Bioeng*. 1977;19(5):649-60.
142. Shevchenko A, Tomas H, Havlis J, Olsen JV, Mann M. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat Protoc*. 2006;1(6):2856-60.
143. De Bessa T, Breuzard G, Allegro D, Devred F, Peyrot V, Barbier P. Tau Interaction with Tubulin and Microtubules: From Purified Proteins to Cells. *Methods Mol Biol*. 2017;1523:61-85.
144. Jiang S, Ghoshdastider U, Narita A, Popp D, Robinson RC. Structural complexity of filaments formed from the actin and tubulin folds. *Commun Integr Biol*. 2016;9(6):e1242538.
145. Nakamura F, Stossel TP, Hartwig JH. The filamins: organizers of cell structure and function. *Cell Adh Migr*. 2011;5(2):160-9.
146. Mezawa M, Pinto VI, Kazembe MP, Lee WS, McCulloch CA. Filamin A regulates the organization and remodeling of the pericellular collagen matrix. *FASEB J*. 2016;30(10):3613-27.
147. Woo SM, Lim HS, Jeong KY, Kim SM, Kim WJ, Jung JY. Vitamin D Promotes Odontogenic Differentiation of Human Dental Pulp Cells via ERK Activation. *Mol Cells*. 2015;38(7):604-9.



148. Barron MJ, McDonnell ST, Mackie I, Dixon MJ. Hereditary dentine disorders: dentinogenesis imperfecta and dentine dysplasia. *Orphanet J Rare Dis.* 2008;3:31.
149. Stein SH, Tipton DA. Vitamin D and its impact on oral health--an update. *J Tenn Dent Assoc.* 2011;91(2):30-3; quiz 4-5.
150. Garcia MN, Hildebolt CF, Miley DD, Dixon DA, Couture RA, Spearie CL, et al. One-year effects of vitamin D and calcium supplementation on chronic periodontitis. *J Periodontol.* 2011;82(1):25-32.
151. Newman AC, Nakatsu MN, Chou W, Gershon PD, Hughes CC. The requirement for fibroblasts in angiogenesis: fibroblast-derived matrix proteins are essential for endothelial cell lumen formation. *Mol Biol Cell.* 2011;22(20):3791-800.
152. Karaoz E, Dogan BN, Aksoy A, Gacar G, Akyuz S, Ayhan S, et al. Isolation and in vitro characterisation of dental pulp stem cells from natal teeth. *Histochem Cell Biol.* 2010;133(1):95-112.
153. Ma Y, Mi YJ, Dai YK, Fu HL, Cui DX, Jin WL. The inverse F-BAR domain protein srGAP2 acts through srGAP3 to modulate neuronal differentiation and neurite outgrowth of mouse neuroblastoma cells. *PLoS One.* 2013;8(3):e57865.
154. Langellotti S, Romano M, Guarnaccia C, Granata V, Orru S, Zagari A, et al. A novel anti-aldolase C antibody specifically interacts with residues 85-102 of the protein. *MAbs.* 2014;6(3):708-17.
155. Vizin T, Kos J. Gamma-enolase: a well-known tumour marker, with a less-known role in cancer. *Radiol Oncol.* 2015;49(3):217-26.
156. Hemler ME. Tetraspanin functions and associated microdomains. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005;6(10):801-11.
157. Ge Q, Chen L, Jaffar J, Argraves WS, Twal WO, Hansbro P, et al. Fibulin1C peptide induces cell attachment and extracellular matrix deposition in lung fibroblasts. *Sci Rep.* 2015;5:9496.
158. Saito K, Fukumoto E, Yamada A, Yuasa K, Yoshizaki K, Iwamoto T, et al. Interaction between fibronectin and beta1 integrin is essential for tooth development. *PLoS One.* 2015;10(4):e0121667.
159. Talapatra S, Wagner JD, Thompson CB. Elongation factor-1 alpha is a selective regulator of growth factor withdrawal and ER stress-induced apoptosis. *Cell Death Differ.* 2002;9(8):856-61.
160. Deimling D, Hannig C, Hoth-Hannig W, Schmitz P, Schulte-Monting J, Hannig M. Non-destructive visualisation of protective proteins in the in situ pellicle. *Clin Oral Investig.* 2007;11(3):211-6.
161. Tjoelker LW, Seyfried CE, Eddy RL, Jr., Byers MG, Shows TB, Calderon J, et al. Human, mouse, and rat calnexin cDNA cloning: identification of potential calcium binding motifs and gene localization to human chromosome 5. *Biochemistry.* 1994;33(11):3229-36.
162. Wheelock MJ, Johnson KR. Cadherins as modulators of cellular phenotype. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2003;19:207-35.
163. Lee CC, Bowman BH, Yang FM. Human alpha 2-HS-glycoprotein: the A and B chains with a connecting sequence are encoded by a single mRNA transcript. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987;84(13):4403-7.
164. Evrard S, Delanaye P, Kamel S, Cristol JP, Cavalier E, calcifications SSjwgov. Vascular calcification: from pathophysiology to biomarkers. *Clin Chim Acta.* 2015;438:401-14.
165. Kalamajski S, Aspberg A, Lindblom K, Heinegard D, Oldberg A. Asporin competes with decorin for collagen binding, binds calcium and promotes osteoblast collagen mineralization. *Biochem J.* 2009;423(1):53-9.

166. Myren M, Kirby DJ, Noonan ML, Maeda A, Owens RT, Ricard-Blum S, et al. Biglycan potentially regulates angiogenesis during fracture repair by altering expression and function of endostatin. *Matrix Biol.* 2016;52-54:141-50.
167. Heo SC, Shin WC, Lee MJ, Kim BR, Jang IH, Choi EJ, et al. Periostin accelerates bone healing mediated by human mesenchymal stem cell-embedded hydroxyapatite/tricalcium phosphate scaffold. *PLoS One.* 2015;10(3):e0116698.
168. Roberts-Clark DJ, Smith AJ. Angiogenic growth factors in human dentine matrix. *Arch Oral Biol.* 2000;45(11):1013-6.
169. Zhang R, Cooper PR, Smith G, Nor JE, Smith AJ. Angiogenic activity of dentin matrix components. *J Endod.* 2011;37(1):26-30.
170. Lee EH, Park HJ, Jeong JH, Kim YJ, Cha DW, Kwon DK, et al. The role of asporin in mineralization of human dental pulp stem cells. *J Cell Physiol.* 2011;226(6):1676-82.
171. Kim N, Yoo JC, Han JY, Hwang EM, Kim YS, Jeong EY, et al. Human nuclear clusterin mediates apoptosis by interacting with Bcl-XL through C-terminal coiled coil domain. *J Cell Physiol.* 2012;227(3):1157-67.
172. Dunzendorfer S, Wiedermann CJ. Neuropeptides and the immune system: focus on dendritic cells. *Crit Rev Immunol.* 2001;21(6):523-57.
173. Boussetta T, Gougerot-Pocidallo MA, Hayem G, Ciappelloni S, Raad H, Arabi Derkawi R, et al. The prolyl isomerase Pin1 acts as a novel molecular switch for TNF- $\alpha$ -induced priming of the NADPH oxidase in human neutrophils. *Blood.* 2010;116(26):5795-802.
174. Zhang J, Zhao GQ, Qu J, Che CY, Lin J, Jiang N, et al. Expression of S100B during the innate immune of corneal epithelium against fungi invasion. *Int J Ophthalmol.* 2016;9(2):191-7.
175. Canzobre MC, Rios H. Pulpar tooth injury induces plastic changes in S100B positive astroglial cells in the trigeminal subnucleus caudalis. *Neurosci Lett.* 2010;470(1):71-5.
176. Liu J, Stevens PD, Li X, Schmidt MD, Gao T. PHLPP-mediated dephosphorylation of S6K1 inhibits protein translation and cell growth. *Mol Cell Biol.* 2011;31(24):4917-27.
177. D'Acquisto F, Merghani A, Lecona E, Rosignoli G, Raza K, Buckley CD, et al. Annexin-1 modulates T-cell activation and differentiation. *Blood.* 2007;109(3):1095-102.
178. Hawiger J, Timmons S, Kloczewiak M, Strong DD, Doolittle RF.  $\gamma$  and  $\alpha$  chains of human fibrinogen possess sites reactive with human platelet receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1982;79(6):2068-71.
179. Stefansson S, Lawrence DA. The serpin PAI-1 inhibits cell migration by blocking integrin  $\alpha$  V  $\beta$  3 binding to vitronectin. *Nature.* 1996;383(6599):441-3.
180. D'Alessandro A, Nemkov T, Moore HB, Moore EE, Wither M, Nydam T, et al. Metabolomics of trauma-associated death: shared and fluid-specific features of human plasma vs lymph. *Blood Transfus.* 2016;14(2):185-94.
181. Kajita M, Sugimura K, Ohoka A, Burden J, Suganuma H, Ikegawa M, et al. Filamin acts as a key regulator in epithelial defence against transformed cells. *Nat Commun.* 2014;5:4428.
182. Bonfoco E, Krainc D, Ankarcona M, Nicotera P, Lipton SA. Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92(16):7162-6.

183. Roll RL, Bauman EM, Bennett JS, Abrams CS. Phosphorylated pleckstrin induces cell spreading via an integrin-dependent pathway. *J Cell Biol.* 2000;150(6):1461-6.
184. Matsumura Y, Sakai J, Skach WR. Endoplasmic reticulum protein quality control is determined by cooperative interactions between Hsp/c70 protein and the CHIP E3 ligase. *J Biol Chem.* 2013;288(43):31069-79.
185. Ma Y, Galluzzi L, Zitvogel L, Kroemer G. Autophagy and cellular immune responses. *Immunity.* 2013;39(2):211-27.
186. Buraschi S, Neill T, Goyal A, Poluzzi C, Smythies J, Owens RT, et al. Decorin causes autophagy in endothelial cells via Peg3. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(28):E2582-91.
187. Nagasawa K, Higashi T, Hosokawa N, Kaufman RJ, Nagata K. Simultaneous induction of the four subunits of the TRAP complex by ER stress accelerates ER degradation. *EMBO Rep.* 2007;8(5):483-9.
188. Cheng M, Xue H, Cao W, Li W, Chen H, Liu B, et al. Receptor for Activated C Kinase 1 (RACK1) Promotes Dishevelled Protein Degradation via Autophagy and Antagonizes Wnt Signaling. *J Biol Chem.* 2016;291(24):12871-9.
189. Mesquita A, Tabara LC, Martinez-Costa O, Santos-Rodrigo N, Vincent O, Escalante R. Dissecting the function of Atg1 complex in Dictyostelium autophagy reveals a connection with the pentose phosphate pathway enzyme transketolase. *Open Biol.* 2015;5(8).
190. Suzuki H, Katayama N, Ikuta Y, Mukai K, Fujieda A, Mitani H, et al. Activities of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-3 on monocytes. *Am J Hematol.* 2004;75(4):179-89.
191. McHeyzer-Williams M, Okitsu S, Wang N, McHeyzer-Williams L. Molecular programming of B cell memory. *Nat Rev Immunol.* 2011;12(1):24-34.
192. Schroeder HW, Jr., Cavacini L. Structure and function of immunoglobulins. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;125(2 Suppl 2):S41-52.
193. Tedoldi S, Paterson JC, Cordell J, Tan SY, Jones M, Manek S, et al. Jaw1/LRMP, a germinal centre-associated marker for the immunohistological study of B-cell lymphomas. *J Pathol.* 2006;209(4):454-63.
194. Lu X, Wang M, Qi J, Wang H, Li X, Gupta D, et al. Peptidoglycan recognition proteins are a new class of human bactericidal proteins. *J Biol Chem.* 2006;281(9):5895-907.
195. Shingai T, Ikeda W, Kakunaga S, Morimoto K, Takekuni K, Itoh S, et al. Implications of nectin-like molecule-2/IGSF4/RA175/SgIGSF/TSLC1/SynCAM1 in cell-cell adhesion and transmembrane protein localization in epithelial cells. *J Biol Chem.* 2003;278(37):35421-7.
196. Boles KS, Barchet W, Diacovo T, Cella M, Colonna M. The tumor suppressor TSLC1/NECL-2 triggers NK-cell and CD8+ T-cell responses through the cell-surface receptor CRTAM. *Blood.* 2005;106(3):779-86.
197. Cheng G, Kong RH, Zhang LM, Zhang JN. Mitochondria in traumatic brain injury and mitochondrial-targeted multipotential therapeutic strategies. *Br J Pharmacol.* 2012;167(4):699-719.
198. Bender IB. Pulpal pain diagnosis--a review. *J Endod.* 2000;26(3):175-9.
199. Flood VH, Al-Mondhiry HA, Farrell DH. The fibrinogen Aalpha R16C mutation results in fibrinolytic resistance. *Br J Haematol.* 2006;134(2):220-6.
200. Ericksen B, Wu Z, Lu W, Lehrer RI. Antibacterial activity and specificity of the six human {alpha}-defensins. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49(1):269-75.

201. Scarpa M, Grillo A, Scarpa M, Brun P, Castoro C, Pozza A, et al. Innate immune environment in ileal pouch mucosa: alpha5 defensin up-regulation as predictor of chronic/relapsing pouchitis. *J Gastrointest Surg.* 2012;16(1):188-201; discussion -2.

## 9 ANEXOS

### 9.1 PARECER DE APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



#### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

##### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Análise proteômica de infecções endodônticas em diferentes condições clínicas

**Pesquisador:** Poliana Amanda Oliveira Silva

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 42846015.2.0000.0030

**Instituição Proponente:** FACULDADE DE SAÚDE - FS

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

##### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 1.217.069

##### Apresentação do Projeto:

A Análise proteômica das infecções endodônticas pode fornecer informações globais sobre mecanismos de patogenicidade e interações multifatoriais existentes entre as bactérias do canal radicular e o início e progressão da periodontite apical. Identificar as proteínas das diferentes condições pulpare e crucial para a compreensão dos mecanismos de revascularização, calcificação dos tecidos, os processos de defesa e reparação de dentina da polpa dental, assim o objetivo do estudo será analisar de forma quantitativa e qualitativa proteínas presentes nas condições clínicas de polpa viva inflamada, necrose pulpar sem presença de lesão perirradicular visível radiograficamente e necrose pulpar com presença de lesão perirradicular visível radiograficamente. Serão selecionados pacientes atendidos na clínica integrada de odontologia da Universidade Católica de Brasília e Universidade de Brasília, encaminhados para tratamento endodôntico com diagnóstico de pulpite e necrose pulpar e como grupo controle polpa hígida de terceiro molar e pré molar, com indicação para exodontia. Após a remoção do conteúdo pulpar, este será transferido para um tubo contendo coquetel inibidor de proteinase (PIC) 0,1 % (Sigma-Aldrich, St Louis, EUA) e imediatamente congelado a -80°C. A extração proteica será pelo método de rompimento mecânico utilizando ultrassom e a identificação por cromatografia acoplada ao espectrometro de massa (LC/MS), utilizando-se bancos de dados de proteínas humanas e de microrganismos do software Proteome Discoverer 1.3. Ressalta-se a importância da realização da



FACULDADE DE CIÊNCIAS DA  
SAÚDE DA UNIVERSIDADE DE  
BRASÍLIA - CEP/FS-UNB



Continuação do Parecer: 1.217.069

pesquisa afim de detalhar a presença de proteínas em diferentes condições clínicas. Os resultados da pesquisa serão divulgados através de artigos científicos e em apresentações em congressos nacionais e internacionais.

**Objetivo da Pesquisa:**

"Objetivo Primario:

Analisar de forma quantitativa e qualitativa proteínas presentes nas condições clínicas de polpa viva inflamada, necrose pulpar sem presença de lesão perirradicular visível radiograficamente e necrose pulpar com presença de lesão perirradicular visível radiograficamente.

Objetivo Secundario:

Realizar proteômica por cromatografia líquida acoplada a um espectrometro de massa microToF-QIII; Identificar proteínas de microrganismos e proteínas humanas, presente nas diversas condições clínicas através do banco de dados SwissProt e TrEMBL usando o algoritmo SEQUEST em software Proteome Discoverer 1.3; Separar e comparar as proteínas encontradas nas situações clínicas de polpa viva inflamada, necrose pulpar sem presença de lesão perirradicular visível radiograficamente e necrose pulpar com presença de lesão perirradicular visível radiograficamente."

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Riscos e benefícios, segundo o pesquisador:

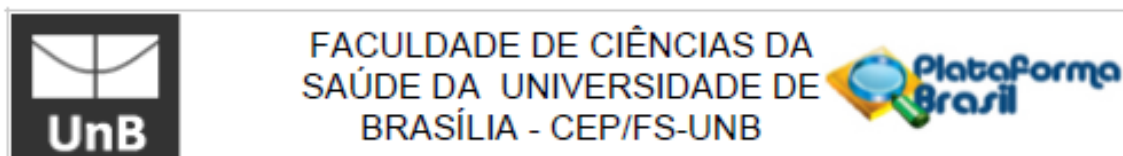
"Riscos:

O projeto não oferece risco direto ao paciente, pois a amostra será recolhida no momento da realização do tratamento endodôntico, que se faz necessário, a fim de permitir a permanência do elemento dentário na cavidade bucal exercendo sua função. Existem riscos inerentes ao procedimento do tratamento endodôntico ou do procedimento cirúrgico, porém, esta não é parte integrante da pesquisa e sim, dos procedimentos necessários para a saúde bucal do paciente. A participação dos pacientes está restrita à doação do conteúdo pulpar e de dentes após o procedimento cirúrgico.

Benefícios:

O benefício do trabalho está na identificação e criação de um protocolo de proteínas, o que pode ocasionar em avanços no entendimento dos mecanismos de revascularização, calcificação dos tecidos e nos processos de defesa e reparação de dentina da polpa dental. Todo este conhecimento é necessário para o desenvolvimento de novas terapias endodônticas, possibilitando um maior percentual de sucesso pós tratamento endodôntico."

Endereço: Faculdade de Ciências da Saúde - Campus Darcy Ribeiro  
 Bairro: Asa Norte CEP: 70.910-900  
 UF: DF Município: BRASÍLIA  
 Telefone: (61)3107-1947 E-mail: ceptsunb@gmail.com



Continuação do Parecer: 1.217.069

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Projeto de Mestrado executado sob a orientação da Professora Taia Maria Berto Resende, Área de concentração: Saúde bucal. Linha de Pesquisa: Prevalência e diagnóstico, prevenção e tratamento das alterações do Complexo Buco-Maxilo-Facial. Faltam documentos comprobatórios do vínculo com a instituição proponente.

Cronograma de execução prevê etapa de "Coleta das Amostras" entre 01/08/2015 e 29/01/2016.

Orcamento no valor total de R\$ 4.130,90, consistindo de reagentes e outros materiais de consumo que serão custeados pela própria pesquisadora.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Foram analisados os seguintes documentos como resposta ao parecer no. 1.022.398:

PB\_INFORMAÇÕES\_BÁSICAS\_DO\_PROJETO\_455699.pdf de 18/08/2015

CartaRespostaPendencias.pdf de 18/08/2015

Termo HRT.pdf de 12/08/2015

Taia - Ato de credenciamento (1).pdf de 12/08/2015

PROJETO MESTRADO CEP (final-PB).docx de 12/08/2015

TCLE - Análise proteômica NOVO!.docx de 12/08/2015

**Recomendações:**

Não se aplica.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Análise das respostas às pendências do parecer no. 1.022.398:

1. Embora seja informado em carta de encaminhamento que trata-se de projeto de mestrado, não está claro o vínculo da pesquisadora responsável com a instituição proponente. Solicita-se informar a que programa de pós-graduação está vinculado, bem como a apresentação de documentos comprobatórios do vínculo com a instituição e com a professora orientadora, Taia Maria Berto Resende, mencionada no projeto detalhado. Foi apresentado o ato de credenciamento da Profa. Taia no programa de Mestrado da FS. **PENDÊNCIA ATENDIDA.**

2. Quanto ao TCLE, solicita-se:

2.a) Incluir contato telefônico e endereço profissional do pesquisador no TCLE, bem como do professor orientador. Foram acrescentadas as informações solicitadas. **PENDÊNCIA ATENDIDA.**

Endereço: Faculdade de Ciências da Saúde - Campus Darcy Ribeiro  
 Bairro: Asa Norte CEP: 70.910-900  
 UF: DF Município: BRASÍLIA  
 Telefone: (61)3107-1947 E-mail: cepfsunb@gmail.com



FACULDADE DE CIÊNCIAS DA  
SAÚDE DA UNIVERSIDADE DE  
BRASÍLIA - CEP/FS-UNB



Continuação do Parecer: 1.217.069

2.b) Revisar a linguagem de forma a tornar mais claro os procedimentos que serão realizados na pesquisa. Por exemplo: como os conteúdos pulpares serão analisados, o que e e qual a utilidade de uma lista proteica das diferentes condições pulpares. Os termos foram esclarecidos. PENDÊNCIA ATENDIDA.

2.c) Substituir o termo "sujeito de pesquisa" por "participante de pesquisa". PENDÊNCIA ATENDIDA.

2.d) Contemplar a garantia de ressarcimento e indenização conforme itens IV.3, subitens g e h, e item IV.4, subitem c, da Resolução CNS 486/2012. Foi colocado o item de forma adequada no TCLE. PENDÊNCIA ATENDIDA.

2.e) Os termos "doação", "doador", "doar" devem ser substituídos pelos termos "ceder o uso", "cessão", "cedente", visto que a propriedade do material biológico é SEMPRE do participante de pesquisa. Solicita-se adequação. PENDÊNCIA ATENDIDA.

2.f) Retirar o campo para preenchimento do nome do participante de pesquisa no primeiro parágrafo. O nome e a assinatura do participante de pesquisa ao final do documento é suficiente para a concordância em participar do estudo. PENDÊNCIA ATENDIDA.

2.g) Informar o que e e qual o papel do CEP. PENDÊNCIA ATENDIDA.

2.h) Atualizar os dados de contato do CEP/FS: telefone (61) 3107-1947, e-mail cepfs@unb.br ou cepfsunb@gmail.com, horário de atendimento ao público de 10:00hs as 12:00hs e de 13:30hs as 15:30hs, de segunda a sexta-feira. PENDÊNCIA ATENDIDA.

3. Solicita-se inserir na Plataforma Brasil, por meio de CNPJ, a Universidade Católica de Brasília como instituição coparticipante vinculando-a ao CEP-UCB. Foi acrescentado ao projeto da plataforma o Hospital Regional de Taquatinga ligado a FEPECS como co-participante. PENDÊNCIA ATENDIDA.

**CONCLUSÃO:** Todas as pendências foram sanadas.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

A realização das atividades do projeto na instituição co-participante está condicionada à

Endereço: Faculdade de Ciências da Saúde - Campus Darcy Ribeiro  
 Bairro: Asa Norte CEP: 70.910-900  
 UF: DF Município: BRASÍLIA  
 Telefone: (61)3107-1947 E-mail: cepfsunb@gmail.com





Continuação do Parecer: 1.217.069

aprovação pelo CEP responsável, o CEP-FEPECS.

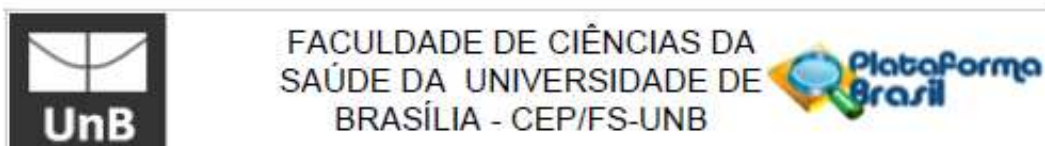
De acordo com a Resolução 486/12 CNS, itens X.1.- 3.b. e XI.2.d, os pesquisadores responsáveis deverão apresentar relatórios parcial semestral e final do projeto de pesquisa, contados a partir da data de aprovação do protocolo de pesquisa.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Outros	encaminhamento unb.pdf	05/03/2015 10:13:42		Aceito
Outros	termo de respons. do pesq.pdf	05/03/2015 10:14:13		Aceito
Folha de Rosto	folha de rosto.pdf	05/03/2015 10:09:19		Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	termo copartic. ucb odonto.pdf	05/03/2015 10:19:34		Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	TERMO DE CONCORDÂNCIA DE INSTITUIÇÃO COPARTICIPANTE.pdf	05/03/2015 10:19:49		Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	termo de concordancia de inst. cop unb.pdf	05/03/2015 10:20:29		Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	termo de ciencia copart unb.pdf	05/03/2015 10:20:54		Aceito
Outros	Currículo do Sistema de Currículos Lattes (Poliana Amanda Oliveira Silva).pdf	05/03/2015 10:23:31		Aceito
Outros	CURRICULO LATES TAIA ATUALIZADO.pdf	05/03/2015 10:23:57		Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	termo de inst proponente.pdf	10/03/2015 18:40:37		Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_455899.pdf	10/03/2015 18:47:35		Aceito
Outros	PB_XML_INTERFACE_REBEC.xml	10/03/2015 18:47:35	Poliana Amanda Oliveira Silva	Aceito
Outros	PB_XML_INTERFACE_REBEC.xml	10/03/2015 18:47:52	Poliana Amanda Oliveira Silva	Aceito
Outros	PB_XML_INTERFACE_REBEC.xml	30/04/2015 21:18:14	Poliana Amanda Oliveira Silva	Aceito

Endereço: Faculdade de Ciências da Saúde - Campus Darcy Ribeiro  
 Bairro: Asa Norte CEP: 70.910-900  
 UF: DF Município: BRASÍLIA  
 Telefone: (61)3107-1947

E-mail: ceptsunb@gmail.com



FACULDADE DE CIÊNCIAS DA  
SAÚDE DA UNIVERSIDADE DE  
BRASÍLIA - CEP/FS-UNB

Continuação do Parecer: 1.217.069

Outros	PB_XML_INTERFACE_REBEC.xml	30/04/2015 21:18:15	Poliana Amanda Oliveira Silva	Aceito
Outros	PB_XML_INTERFACE_REBEC.xml	30/04/2015 21:20:05	Poliana Amanda Oliveira Silva	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE - Análise proteomica NOVO!.docx	12/08/2015 18:47:47		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO MESTRADO CEP (final-PB).docx	12/08/2015 18:49:43		Aceito
Outros	Taia - Ato de credenciamento (1).pdf	12/08/2015 19:06:00		Aceito
Outros	Termo HRT.pdf	12/08/2015 19:07:41		Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_455699.pdf	12/08/2015 19:08:41		Aceito
Outros	PB_XML_INTERFACE_REBEC.xml	12/08/2015 19:08:46	Poliana Amanda Oliveira Silva	Aceito
Outros	CartaRespostaPendencias.pdf	18/08/2015 20:50:45	Poliana Amanda Oliveira Silva	Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_455699.pdf	18/08/2015 20:51:22		Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

BRASILIA, 07 de Setembro de 2015

Assinado por:  
**Keila Elizabeth Fontana**  
(Coordenador)

Endereço: Faculdade de Ciências da Saúde - Campus Darcy Ribeiro  
 Bairro: Asa Norte CEP: 70.910-900  
 UF: DF Município: BRASÍLIA  
 Telefone: (61)3107-1947 E-mail: cepfsunb@gmail.com

## 9.2 ANEXO B – TABELAS DE IDENTIFICAÇÕES PROTEICA

Tabela 2 – Relação de proteínas identificadas exclusivamente no grupo com diagnóstico de polpa normal, separadas pelo código de cada proteína no banco de dados Uniprot, média do *score* no *software ProteinLynx Global Server* (PLGS), média de cobertura, função e localização celular.

Código Uniprot	Descrição da proteína	Score	Média de cobertura (%)	Localização
<b>Função biológica: Metabolismo e vias de energia</b>				
F6XY72_HUMAN	HCG2001850 isoforma CRA c	809,18	26,83	Citoplasma
ALDOC_HUMAN	Frutose bisfosfato aldolase C	532,96	16,76	Citoplasma e extracelular
AT1B1_HUMAN	ATPase de transporte de potássio de sódio subunidade beta 1	449,89	17,16	Citoplasma
U3KQP4_HUMAN	Fragmento de gama enolase	360,35	27,4	Citoplasma e membrana celular
H3BT25_HUMAN	Fragmento de piruvato kinase	1640,97	27,15	Citoplasma e núcleo
<b>Função biológica: Crescimento, proliferação e/ou manutenção</b>				
A6NNI4_HUMAN	Tetraspanina	1154,04	25,79	Membrana celular
S4R3C6_HUMAN	Fragmento de fator de crescimento de transformação induzida por proteína beta Ig h3	4278,56	33,79	Extracelular
B5MCB5_HUMAN	Fragmento de proteína 1 de ligação ao ácido retinóico celular	508,69	19,47	Citoplasma
TSN1_HUMAN	Tetraspanina 1	257,81	7,47	Membrana celular
H0Y4K8_HUMAN	Fragmento de fibronectina GN FN1 PE 1 SV 1	252,15	7,88	Extracelular
<b>Função biológica: Metabolismo de proteínas</b>				
AACT_HUMAN	Antiquimotripsina Alfa 1	332,5	21,04	Extracelular e núcleo
H0YD35_HUMAN	Transporte de colina como fragmento de proteína 3	387,49	26,61	Membrana celular
DS13B_HUMAN	Proteína de fosfatase 13 isoforma B de dupla especificidade	306,77	4,55	Citoplasma
E9PQ34_HUMAN	Fragmento de serpina H1	481,94	15,49	Retículo endoplasmático
A0A087WTE1_HUMAN	Inibidor da cadeia pesada H2 de tripsina inter alfa	630,06	11,64	Extracelular

<b>G3V595_HUMAN</b>	Fragmento de antiqumotripsina	199,84	17,7	Extracelular
<b>Função biológica: Regulação de nucleobases, nucleosídeo e nucleotídeos. Metabolismo do ácido nucleico</b>				
<b>ERN1_HUMAN</b>	Proteína serina treonina quinase endoribonuclease	17,04	12,7	Retículo endoplasmático
<b>LRRF2_HUMAN</b>	Rica repetição de leucina da proteína 2	17,04	15,08	Citoplasma
<b>E9PQN5_HUMAN</b>	Fragmento de proteína serina treonina fosfatase 2A 56 kDa subunidade reguladora beta	276,72	9,91	Membrana do retículo endoplasmático
<b>Função biológica: Atividade de remodelação tecidual e/ou formação de tecido ósseo</b>				
<b>C9JV77_HUMAN</b>	Glicoproteína alfa 2 HS GN PE 1 SV1	438,84	11,41	Extracelular
<b>C9JKG1_HUMAN</b>	Fragmento de biglican	412,33	19,75	Extracelular
<b>FBN2_HUMAN</b>	Fibrilina 2 GN FBN2 PE 1 SV 3	1416,14	15,01	Extracelular
<b>B1ALD9_HUMAN</b>	Periostina	255,92	17,57	Extracelular
<b>Função biológica: Transporte</b>				
<b>D6RF35_HUMAN</b>	Proteína de ligação da vitamina D	1116,08	20,38	Extracelular
<b>APOA2_HUMAN</b>	Apolipoproteína A II	505,37	20	Extracelular
<b>HOYD17_HUMAN</b>	Fragmento da família anquirina contendo proteína 36C	344,22	27,87	Citoplasma e membrana celular
<b>S35F1_HUMAN</b>	Membro F1 da família portadora de soluto 35	434,4	10,78	Membrana celular
<b>D6RF20_HUMAN</b>	Fragmento proteína de ligação da vitamina D	330,77	24,14	Extracelular
<b>V9GYG9_HUMAN</b>	Fragmento Apolipoproteína A II	2932,76	31,58	Extracelular
<b>F8WEA3_HUMAN</b>	Proteína relacionada a miotubularina 14	492,88	46,48	Citoplasma e membrana celular
<b>V9GYR2_HUMAN</b>	Fragmento subunidade ATPase transportadora de potássio de sódio beta	419,48	30	Membrana
<b>E9PFZ2_HUMAN</b>	Ceruloplasmina	274,87	17,97	Citoplasma
<b>H7C5R1_HUMAN</b>	Fragmento ceruloplasmina	292,52	21,24	Citoplasma
<b>Função biológica: Processo de apoptose</b>				
<b>K7EKR3_HUMAN</b>	Fragmento subunidade do complexo ativador do proteasoma 3	340,07	46,22	Núcleo e citoplasma
<b>U17L1_HUMAN</b>	Ubiquitina carboxil terminal hidrolase 17 like proteína 1	333,21	6,98	Retículo endoplasmático e núcleo
<b>U17L3_HUMAN</b>	Ubiquitina carboxil terminal hidrolase 17 like proteína 3	333,21	6,98	Núcleo e retículo endoplasmático
<b>EF1A2_HUMAN</b>	Fator 1 de alongamento alfa 2	881,47	11,23	Núcleo
<b>Função biológica: Resposte imune</b>				

<b>H7C526_HUMAN</b>	Fragmento do fator complemento B	747,77	25	Extracelular
<b>CFAB_HUMAN</b>	Fator complemento B	1166,22	11,65	Extracelular
<b>C9JRT3_HUMAN</b>	Fragmento do fator complemento B	281,98	35,42	Extracelular
<b>A0A0G2JNK4_HUMAN</b>	Ig gama 1 região C	31687,68	60,13	Extracelular
<b>A0A0G2JH38_HUMAN</b>	Fragmento do fator complemento B	459,02	9,85	Extracelular
<b>H7C5H1_HUMAN</b>	Fragmento do fator complemento B	1043,65	16,72	Extracelular
<b>A0A075B6L1_HUMAN</b>	Fragmento Ig lambda 7 região C	16090,21	32,08	Extracelular
<b>KV101_HUMAN</b>	Ig kappa cadeia V região I PE 1 SV 1	342,72	37,04	Extracelular e membrana

**Função biológica: Comunicação celular, sinal de transdução e adesão celular**

<b>A0A0A0MT20_HUMAN</b>	Fragmento EMILIN 1	231,3	14,7	Extracelular
<b>A0A0C4DFX3_HUMAN</b>	EMILIN 1	385,18	13,19	Extracelular
<b>EMIL1_HUMAN</b>	EMILIN 1	385,18	13,19	Extracelular

**Função biológica: Resposta ao stress**

<b>DUOX1_HUMAN</b>	Oxidase dupla 1	458,89	7,54	Citoplasma e membrana celular
<b>C9J3N8_HUMAN</b>	Proteína <i>heat shock</i> beta 1	2586,68	45,95	Citoplasma e núcleo
<b>F8WE04_HUMAN</b>	Proteína <i>heat shock</i> beta 1	257,58	20,97	Citoplasma e núcleo
<b>V9GZ37_HUMAN</b>	Proteína <i>heat shock</i> 70 kDa 1A GN HSPA1A PE 1 SV 1	123,73	6,72	Citoplasma

**Função biológica: Diferenciação de células nervosas**

<b>A0A075B7E9_HUMAN</b>	Fragmento SLIT ROBO Rho GTPase ativando proteína 2	381,45	30,27	Citoplasma
<b>A0A0D9SG53_HUMAN</b>	Fragmento domínio 4 LIM da proteína 1	360,18	12,31	Núcleo

**Função biológica: Reparo, replicação e regulação de DNA**

<b>H3BSZ6_HUMAN</b>	Enonuclease de junção cruzada provável EME2	347,17	32,17	Núcleo
<b>H2B1L_HUMAN</b>	Histona H2B tipo 1 L	5487,03	15,08	Núcleo
<b>H2B1O_HUMAN</b>	Histona H2B tipo 1 O	6966,89	7,14	Núcleo
<b>H2BFS_HUMAN</b>	Histona H2B tipo F S	4503,21	26,19	Citoplasma, extracelular e núcleo

**Função biológica: Ligado ao íon cálcio**

<b>D6RHJ3_HUMAN</b>	Fragmento Calnexina	1212,07	20,25	Retículo endoplasmático
<b>GELS_HUMAN</b>	Gelsolin GSN PE 1 SV 1	1405,28	21,1	Citoplasma
<b>Q9NTY2_HUMAN</b>	Fragmento caderina <i>like</i> da proteína 26 GN CDH26 PE 4 SV 2	322,31	33,75	Membrana celular
<b>H0YN52_HUMAN</b>	Fragmento Anexina	26416,74	47,46	Citoplasma e extracelular

**Função biológica: Constituinte estrutural do citoesqueleto**

<b>TBB1_HUMAN</b>	Tubulina cadeia beta 1	327,47	4,66	Citoplasma
<b>TBB3_HUMAN</b>	Tubulina cadeia beta 3	2275,66	7,78	Citoplasma e núcleo
<b>F8VX09_HUMAN</b>	Fragmento tubulina cadeia alfa 1B	45787,86	74,67	Citoplasma e núcleo
<b>M0QY85_HUMAN</b>	Fragmento tubulina cadeia beta 4A	1972,45	44,86	Citoplasma e núcleo
<b>E9PK25_HUMAN</b>	Cofilina 1	3575,19	37,25	Citoplasma
<b>D6RJE7_HUMAN</b>	Fragmento do ligante de cálcio de domínio em dupla espiral contendo proteína 2	676,35	22,02	Citoplasma
<b>E9PQB7_HUMAN</b>	Fragmento Cofilina 1	3177,92	40,98	Citoplasma
<b>A0A087WWY3_HUMAN</b>	Filamina A	666,58	24,28	Citoplasma
<b>K2C7_HUMAN</b>	Queratina tipo II citoesqueletal 7GN KRT7 PE 1 SV 5	455,4	11,51	Citoplasma
<b>Função biológica: Desconhecidas</b>				
<b>D6RHW8_HUMAN</b>	Proteína <i>RING finger</i> 44	465,3	54,35	Desconhecida
<b>H9KVB3_HUMAN</b>	Otogelina	17,04	10,2	Desconhecida
<b>RANDOM18790</b>	Sequencia Random 18790	17,04	17,7	Desconhecida
<b>RANDOM14045</b>	Sequencia Random 14045	433,82	17,2	Desconhecida

Tabela 3 – Relação de proteínas identificadas exclusivamente no grupo com diagnóstico de pulpíte irreversível, separadas pelo código de cada proteína no banco de dados Uniprot, média do score no software *ProteinLynx Global Server* (PLGS), média de cobertura, função e localização celular.

Código Uniprot	Descrição da proteína	Score	Média de cobertura (%)	Localização
<b>Função biológica: Metabolismo e Vias de energia</b>				
AL1A1_HUMAN	Desidrogenase retinol 1	1254,37	22,75	Citoplasma
KI20A_HUMAN	Proteína <i>like</i> kinesina KIF20A	367,43	5,51	Citoplasma
PGK2_HUMAN	Fosfoglicerato kinase 2	76,08	5,04	Citoplasma
Q5SYQ7_HUMAN	Fragmento de Desidrogenase retinol 1	460,33	18,72	Citoplasma
F5GYU2_HUMAN	Fragmento L lactato desidrogenase cadeia A	328,13	15,97	Citoplasma
F8W079_HUMAN	Fragmento ATP sintase subunidade beta mitocondrial	96,08	10,21	Citoplasma
MDHM_HUMAN	Malato desidrogenase mitocondrial	379,48	17,46	Mitocôndria
<b>Função biológica: Crescimento, proliferação e/ou manutenção celular</b>				
H7C293_HUMAN	Fragmento do fuso mitótico 2B	237,6	42,5	Citoplasma
<b>Função biológica: Metabolismo de proteínas</b>				
LGUL_HUMAN	Lactoglutationa liase	438,48	13,59	Citoplasma e extracelular
<b>Função biológica: Regulação de nucleobases, nucleosídeo e nucleotídeos. Metabolismo do ácido nucleico</b>				
H0YDV1_HUMAN	Fragmento da proteína dedo de zinco 195	389,47	30,77	Núcleo
A0A087WUI2_HUMAN	Ribonucleoproteínas nucleares heterogêneas A2 B1	363,44	12,64	Núcleo
H0YIB4_HUMAN	Fragmento de fator de união rico em serina arginina 9	509,25	35,45	Núcleo
<b>Função biológica: Atividade de remodelação tecidual e/ou formação de tecido ósseo e/ou dentinário</b>				
Q5TBF2_HUMAN	Asporina	306,83	15,64	Extracelular
<b>Função biológica: Transporte</b>				
H7BY35_HUMAN	Receptor rianodina 2	0,23	4,14	Membrana celular
CAH2_HUMAN	Anidrase carbônica 2	264,7	24,23	Citoplasma e membrana
E5RHP7_HUMAN	Fragmento anidrase carbônica 1	27941,15	39,84	Citoplasma
A0A0C4DGB6_HUMAN	Albumina sérica	53507,49	63,74	Extracelular

<b>F5H481_HUMAN</b>	Fragmento da transferência de elétrons da flavoproteína lisina metiltransferase subunidade beta	743,67	87,8	Citoplasma e mitocôndria
<b>D6RBI1_HUMAN</b>	Proteína de triagem vacular SNF8	427,73	9,84	Citoplasma, núcleo e membrana

**Função biológica: Apoptose**

<b>ACTN3_HUMAN</b>	Alfa actinina 3	182,45	10,21	Citoplasma e extracelular
<b>E7ERK6_HUMAN</b>	Fragmento de clusterina	73,47	5,88	Citoplasma, núcleo e extracelular
<b>PHLP1_HUMAN</b>	Proteína fosfatase 1 contendo repetição rica em leucina de domínio PH	327,51	5,42	Citoplasma, núcleo e membrana
<b>G3V2W4_HUMAN</b>	Fragmento alfa actinina 1	325,7	18,07	Citoplasma e extracelular
<b>E7ERK6_HUMAN</b>	Fragmento clusterina	73,47	5,88	Citoplasma, núcleo e extracelular
<b>H0YDL5_HUMAN</b>	Fragmento da proteína Ras relacionada a Rab 2A	339,09	15,94	Citoplasma

**Função biológica: Resposta Imune**

<b>B7Z2E6_HUMAN</b>	Proteína zeta delta 14 3 3	834,91	15,2	Citoplasma
<b>SCG2_HUMAN</b>	Secretogranina 2	282,56	10,86	Extracelular
<b>S100B_HUMAN</b>	Proteína S100 B	744,64	23,91	Citoplasma e núcleo
<b>C9J5S7_HUMAN</b>	Peptidil prolil cis trans isomerase	326,22	22,31	Citoplasma
<b>A0A075B6K2_HUMAN</b>	Fragmento HCG2041210	490,42	25,64	Extracelular e membrana
<b>FIBG_HUMAN</b>	Fibrinogênio gama	305,27	11,26	Extracelular
<b>VTNC_HUMAN</b>	Vitronectina	223,06	8,58	Extracelular
<b>J9JIE0_HUMAN</b>	Família C do receptor acoplado à proteína G grupo 5 membro C	500,48	22,22	Citoplasma e membrana

**Função biológica: Comunicação celular e sinal de transdução**

<b>Q5TI78_HUMAN</b>	Fragmento homólogo da proteína de histidina metiltransferase 1	1840,33	18,48	Citoplasma e núcleo
---------------------	--	---------	-------	---------------------

**Função biológica: Stress**

<b>C9JIT0_HUMAN</b>	Fragmento da proteína 3 contendo domínio de tioredoxin	194,17	8,62	Citoplasma, núcleo e extracelular
<b>PRDX3_HUMAN</b>	Tioredoxina dependente peróxido redutase mitocondrial	462,25	16,41	Citoplasma
<b>TXND3_HUMAN</b>	Domínio 3 da tioredoxina	208,64	5,61	Citoplasma

**Função biológica: Diferenciação de células nervosas**

<b>1433G_HUMAN</b>	Proteína 14 3 3 gama	512,58	21,46	Citoplasma
--------------------	----------------------	--------	-------	------------



<b>DPYL2_HUMAN</b>	Proteína relacionada à di-hidropirimidase 2	258,92	20,98	Citoplasma e membrana
<b>Função biológica: Reparo, replicação e regulação de DNA</b>				
<b>J3QS39_HUMAN</b>	Fragmento poliubiquitina B	1682,89	47,31	Citoplasma e núcleo
<b>B2R4S9_HUMAN</b>	Histona H2B	4735,59	15,08	Citoplasma, núcleo e extracelular
<b>U3KQK0_HUMAN</b>	Histona H2B	5098	5,42	Citoplasma, extracelular e núcleo
<b>K7EP01_HUMAN</b>	Histona H3 3	201,5	14,16	Núcleo
<b>A0A0G2JI50_HUMAN</b>	Fragmento fator de alongamento negativo E	220,13	27,92	Núcleo
<b>Função biológica: Ligado ao íon cálcio</b>				
<b>J3KPK8_HUMAN</b>	Subunidade solúvel alfa 3 da guanilato ciclase	274,05	13,66	Citoplasma e membrana
<b>H0YKS4_HUMAN</b>	Fragmento anexina	95324,8	52,84	Citoplasma e extracelular
<b>Função biológica: Constituinte estrutural do citoesqueleto</b>				
<b>C9J7Y4_HUMAN</b>	Fragmento de proteína 2 associado ao citoesqueleto	335,35	23,71	Citoplasma
<b>G3V1A4_HUMAN</b>	Cofilina 1 não muscular isoforma CRAa	1963,26	33,56	Citoplasma
<b>K7ESM5_HUMAN</b>	Fragmento da tubulina cadeia beta 6	73,91	4,14	Citoplasma
<b>ARP3_HUMAN</b>	Proteína relacionada a actina 3	307,76	17,94	Citoplasma
<b>F8WE98_HUMAN</b>	Fragmento de filamina A	101,91	5,79	Citoplasma
<b>U3KPR1_HUMAN</b>	Queratina tipo II Hb6	1402,24	9,79	Citoplasma
<b>A0A087X106_HUMAN</b>	Queratina tipo II Hb1	114,31	1,45	Citoplasma
<b>Função biológica: Desconhecido</b>				
<b>K7EMB1_HUMAN</b>	Proteína homóloga RING	619,63	87,8	Desconhecida
<b>RANDOM34765</b>	Sequência Random 34765	32,42	0,36	Desconhecida
<b>RANDOM8432</b>	Sequência Random 8432	316,34	0,28	Desconhecida
<b>RANDOM62619</b>	Sequência Random 62619	32,42	0,39	Desconhecida
<b>A0A0A0MS97_HUMAN</b>	Proteína 178 contendo domínio da espiral	259,19	19,24	Desconhecida
<b>POTEI_HUMAN</b>	Domínio anykin membro da família POTE	11832,19	5,4	Extracelular

Tabela 4 – Relação de proteínas identificadas exclusivamente no grupo com diagnóstico de polpa necrosada, separadas pelo código de cada proteína no banco de dados Uniprot, média do score no software *ProteinLynx Global Server* (PLGS), média de cobertura, função e localização celular.

<b>Código Uniprot</b>	<b>Descrição da proteína</b>	<b>Score</b>	<b>Média de cobertura (%)</b>	<b>Localização</b>
<b>Função biológica: Metabolismo e vias de energia</b>				
<b>H3BUH7_HUMAN</b>	Fragmento de Frutose bisfosfato aldolase A	332,99	9,03	Citoplasma
<b>CTLFB_HUMAN</b>	Putativo centaurina gama como membro da família 11P	361,04	6,86	Citoplasma
<b>F5H6W8_HUMAN</b>	L lactato desidrogenase cadeia A	685,03	25,53	Citoplasma
<b>E5RI09_HUMAN</b>	Fragmento de beta enolase PE 1 SV 1	1878,72	33,78	Citoplasma
<b>F5H6T1_HUMAN</b>	Actina ARP2 relacionada com a proteína 2 homóloga da isoforma de levedura CRA d	548,85	8,55	Citoplasma
<b>E5RGZ4_HUMAN</b>	Fragmento beta enolase PE 1 SV 1	32,11	2,12	Citoplasma
<b>Crescimento, proliferação e manutenção celular</b>				
<b>H0YJD7_HUMAN</b>	Fragmento de proteína centrossomal de 128 kDa CEP128 PE 1 SV 1	423,95	16,55	Citoplasma e núcleo
<b>CE128_HUMAN</b>	Proteína centrossomal de 128 kDa CEP128 PE 1 SV 2	492,85	6,58	Citoplasma
<b>X6RE90_HUMAN</b>	Fragmento de quinase dependente de ciclina 9	516,02	47,42	Citoplasma
<b>Função biológica: Metabolismo de proteínas</b>				
<b>E5RHN7_HUMAN</b>	Fragmento da lipoproteína lipase	417,96	28,3	Extracelular
<b>RS18_HUMAN</b>	40S proteína ribossomal S18	389,9		Ribossomos
<b>Regulação de nucleobases, nucleosídeo e nucleotídeos. Metabolismo do ácido nucleico</b>				
<b>KRBA1_HUMAN</b>	Proteína KRBA1	52,94	13,16	Núcleo
<b>K7ER91_HUMAN</b>	Fragmento de domínio de repetição GAP Arf com GTPase e PH da proteína 4	345,46	21,9	Citoplasma e núcleo
<b>Função biológica: Transporte</b>				
<b>D6RBV2_HUMAN</b>	Proteína da membrana integral vesicular VIP36	359,45	34,15	Membrana
<b>D6RDX1_HUMAN</b>	Fragmento da proteína da membrana integral vesicular VIP36	340,2	31,94	Membrana
<b>M0QZ52_HUMAN</b>	Calmodulina	810,89	48,19	Membrana
<b>E9PBW4_HUMAN</b>	Subunidade de hemoglobina gama 2 PE 1 SV 1	25312,49	30,66	Citoplasma e extracelular

<b>A8MUF7_HUMAN</b>	Fragmento da subunidade hemoglobina epsilon	528,06	13,14	Membrana e extracelular
<b>FRIL_HUMAN</b>	Ferritina	524,53	28	Citoplasma, extracelular, membrana
<b>X6R2W0_HUMAN</b>	Sintaxina 10	434	15	Membrana
<b>D6RBG7_HUMAN</b>	Fragmento da subunidade beta de coatomer	441,43	23,6	Citoplasma
<b>Função biológica: Processo de apoptose</b>				
<b>A0A087WV01_HUMAN</b>	Fator de alongação alfa 1	2054,46	39,44	Citoplasma
<b>M0R3I7_HUMAN</b>	Fragmento da família Pleckstrina com domínio B membro 3	187,68	26,36	Membrana, citoplasma e extracelular
<b>C9JUP7_HUMAN</b>	Fragmento de ATPase transicional do retículo endoplasmático	113,33	12,17	Citoplasma, retículo endoplasmático e núcleo
<b>SDF2L_HUMAN</b>	Proteínas semelhantes ao fator 2 derivadas de células estromais	170,86	15,84	Retículo endoplasmático
<b>Função biológica: Resposta imune</b>				
<b>A0A140T9G0_HUMAN</b>	Fragmento de HLA classe I antígeno de histocompatibilidade B 46 cadeia alfa	176,41	19,5	Membrana
<b>A0A087WXL8_HUMAN</b>	Ig gama cadeia 3 região C	16039,78	31,91	Membrana e extracelular
<b>F8VRE4_HUMAN</b>	Fragmento de proteína de membrana restrita linfóide	487,61	30,51	Citoplasma, núcleo e membrana do retículo endoplasmático
<b>1B13_HUMAN</b>	HLA classe I antígeno de histocompatibilidade B 13 cadeia alfa	80,93	3,59	Membrana
<b>1433B_HUMAN</b>	Proteína 14 3 3 beta alfa	615,01	18,7	Citoplasma
<b>H0YG94_HUMAN</b>	Fragmento de molécula 1 de adesão celular	445,12	17,46	Membrana de leucócitos
<b>HV316_HUMAN</b>	Ig cadeia V III região TEI	8456,42	47,06	Extracelular e membrana
<b>E9PIM6_HUMAN</b>	Fragmento glicoproteína Thy 1 de membrana	215,6	18,95	Extracelular e membrana
<b>PGRP1_HUMAN</b>	Proteína de reconhecimento de peptidoglicano 1	2169,51	39,29	Extracelular
<b>LV301_HUMAN</b>	Ig lambda cadeia V III região SH	1234,51	16,67	Extracelular e membrana
<b>A0A075B6N7_HUMAN</b>	Fragmento Ig alfa 2 região C	4281,18	27,06	Extracelular e membrana
<b>J3JS34_HUMAN</b>	Fragmento do receptor interleucina 3 alfa	132,93	12,2	Membrana
<b>LRMP_HUMAN</b>	Proteína de membrana restrita linfóide	509,87	17,84	Membrana
<b>LV403_HUMAN</b>	Ig lambda cadeia V região H	832,62	17,76	Extracelular e membrana
<b>NGAL_HUMAN</b>	Lipocalina associada a gelatina neutrofílica	861,2	30,81	Citoplasma e extracelular
<b>HV318_HUMAN</b>	Ig cadeia V III região TUR	1801,33	20,69	Extracelular e membrana
<b>PRDX1_HUMAN</b>	Peroxiredoxina 1	1054,85	36,18	Extracelular e membrana
<b>Função biológica: Comunicação celular, sinal de transdução e adesão celular</b>				

<b>X6R3K3_HUMAN</b>	Subunidade reguladora de fosfoinosítido 3 quinase 5	339,1	10,43	Citoplasma, membrana e núcleo
<b>H7C3B0_HUMAN</b>	Fragmento calmodulina lisina N metiltransferase	1080,18	60,24	Citoplasma
<b>O11H7_HUMAN</b>	Receptor olfatório 11H7	147,37	6,69	Membrana
<b>E9PK71_HUMAN</b>	Fragmento de placofilina 3 PE 1 SV 1	657,82	46,7	Núcleo e citoplasma
<b>E9PQ15_HUMAN</b>	Fragmento de placofilina 3 PE 1 SV 2	570,36	32,39	Núcleo e citoplasma
<b>PKP3_HUMAN</b>	Placofilina 3	634,87	16,44	Núcleo e membrana
<b>PPIB_HUMAN</b>	Peptil polil cis trans isomerase B	412,29	18,06	Retículo endoplasmático, membrana e núcleo

#### Função biológica: Resposta ao stress

<b>E9PKE3_HUMAN</b>	Proteína cognata de choque térmico de 71 kDa	971,86	9,73	Citoplasma, núcleo e membrana
<b>H0YA63_HUMAN</b>	Fragmento homólogo DnaJ subfamília C membro 13	405,66	22,92	Citoplasma, membrana e extracelular
<b>DJC13_HUMAN</b>	Homólogo Dnaj subfamília C membro 13	434,36	5,8	Citoplasma, extracelular, membrana
<b>PERE_HUMAN</b>	Peroxidase de eosinófilos	370,38	6,57	Citoplasma
<b>I3NI03_HUMAN</b>	Fragmento de proteína isomerase dissulfeto PE 1 SV 1	346,74	20,48	Citoplasma
<b>I3L312_HUMAN</b>	Fragmento de proteína isomerase dissulfeto PE 1 SV 2	1735,07	41,35	Retículo endoplasmático, extracelular, membrana
<b>KPYR_HUMAN</b>	Piruvato quinase PKLR	453,42	14,98	Citoplasma e extracelular
<b>HSP77_HUMAN</b>	Putativo <i>heat shock</i> 70 kDa proteína 7	416,73	14,71	Extracelular
<b>I3L239_HUMAN</b>	Fragmento da proteína <i>heat shock</i> de 75 kDa mitocondrial	504,86	10761	Mitocôndria
<b>KPYM_HUMAN</b>	Piruvato quinase PKM	377,1	23,35	Citoplasma e núcleo
<b>F5H4Q8_HUMAN</b>	E3 proteína ubiquitina ligase Mdm2	519,55	34,12	Núcleo
<b>ALDH2_HUMAN</b>	Aldeído desidrogenase mitocondrial	402,2	6,96	Extracelular e mitocôndria

#### Função biológica: Reparo, replicação e regulação de DNA

<b>H2B2D_HUMAN</b>	Histona putativa H2B tipo 2 D	424,43	20,12	Núcleo
<b>H2AV_HUMAN</b>	Histona H2A V	8581,86	23,44	Núcleo
<b>H2B1H_HUMAN</b>	Histona H2B tipo 1 H	13616,7	15,08	Núcleo
<b>C9J0D1_HUMAN</b>	Histona H2A	10329,16	10,25	Núcleo
<b>H2B1B_HUMAN</b>	Histona H2B tipo 1 B	5108,24	15,08	Núcleo
<b>BCOR_HUMAN</b>	BCL 6 correpressor	52,94	0,23	Núcleo
<b>A8MYV2_HUMAN</b>	LUC7	495,95	1,84	Núcleo

#### Função biológica: Ligação do íon cálcio

<b>D6RCA8_HUMAN</b>	Fragmento de anexina ANXA3 PE 1 SV 1	469,8	23,88	Citoplasma
---------------------	--------------------------------------	-------	-------	------------

<b>H0YNP5_HUMAN</b>	Fragmento de anexina ANXA2 PE 1 SV 1	10162,56	31,43	Citoplasma
<b>AXA2L_HUMAN</b>	Anexina putativa A2	7801,4	26,25	Extracelular
<b>D6RFG5_HUMAN</b>	Fragmento de anexina ANXA3 PE 1 SV 2	307,61	27,92	Citoplasma

**Função biológica: Constituinte estrutural do citoesqueleto**

<b>I3L3D5_HUMAN</b>	Fragmento de profilina PE 1 SV 1	720,47	16,97	Citoplasma
<b>E9PN54_HUMAN</b>	Fragmento da proteína 2 banda 4	789,93	24,58	Citoplasma
<b>ACTS_HUMAN</b>	Alfa actina do musculo esquelético	24326,49	28,78	Citoplasma
<b>C9JDL2_HUMAN</b>	Fragmento de tubulina alfa 4A PE 1 SV 7	636,22	29,17	Citoplasma
<b>C9JDS9_HUMAN</b>	Fragmento de tubulina alfa 4A PE 1 SV 1	657,85	42,31	Citoplasma
<b>E9PHY5_HUMAN</b>	Proteína 2, banda 4 PE 1 SV 1	800,98	9,63	Citoplasma, núcleo, membrana
<b>E7EQR4_HUMAN</b>	Ezrina	47,44	1,54	Citoplasma e membrana
<b>ACTH_HUMAN</b>	Actina gama músculo liso	5542,74	28,19	Citoplasma
<b>C9JEV8_HUMAN</b>	Fragmento de tubulina alfa 4A PE 1 SV 1	200,84	13,73	Citoplasma
<b>TBAL3_HUMAN</b>	Tubulina alfa 3 PE 1 SV 2	14,99	1,57	Citoplasma
<b>H0YJP2_HUMAN</b>	Fragmento Kinectina	484,07	7,97	Citoplasma
<b>C9JTG5_HUMAN</b>	Fragmento da queratina citoesquelética 15 tipo 1	271,98	21,36	Citoplasma
<b>F5GWP8_HUMAN</b>	Fragmento da queratina citoesquelética 17 tipo 1	391,58	12,32	Citoplasma
<b>K1C19_HUMAN</b>	Fragmento da queratina citoesquelética 19 tipo 1	893,13	20	Citoplasma
<b>K1C9_HUMAN</b>	Fragmento da queratina citoesquelética 9 tipo 1	721,65	7,38	Citoplasma
<b>C9JM50_HUMAN</b>	Fragmento da queratina citoesquelética 19 tipo 1	1216,13	8,16	Citoplasma
<b>KRT86_HUMAN</b>	Queratina tipo 2 Hb6	394,07	3,91	Citoplasma
<b>F8VS61_HUMAN</b>	Fragmento da queratina citoesquelética 1B tipo II	238,87	2,82	Citoplasma
<b>KRT85_HUMAN</b>	Queratina tipo II Hb5 PE 1 SV 1	421,19	14,79	Citoplasma
<b>K22E_HUMAN</b>	Queratina tipo II citoesquelética 2 PE 1 SV 2	2000,15	18,62	Citoplasma
<b>K7EPJ9_HUMAN</b>	Fragmento de queratina tipo I citoesquelética 17	1848,4	9,96	Citoplasma
<b>K2C71_HUMAN</b>	Queratina tipo II citoesquelética 71 PE 1 SV 2	238,87	1,34	Citoplasma
<b>K2C79_HUMAN</b>	Queratina tipo II citoesquelética 79 PE 1 SV 2	1184,75	15,89	Citoplasma
<b>H0YIN9_HUMAN</b>	Fragmento de queratina tipo II citoesquelética 5 PE 1 SV 1	817,19	11,22	Citoplasma

**Função biológica: Regulação de proliferação celular e de autofagia**

<b>F8VX58_HUMAN</b>	Fragmento decorin	761,97	21,85	Citoplasma e extracelular
<b>C9J3L8_HUMAN</b>	Proteína translocon associada a subunidade alfa	783,18	20,75	Retículo endoplasmático
<b>TERA_HUMAN</b>	ATPase de transição de retículo endoplasmático PE 1 SV 4	218,86	15,14	Citoplasma, núcleo e retículo endoplasmático
<b>H0YJW3_HUMAN</b>	Fragmento alfa actinina 1 PE 1 SV 1	552,83	9,56	Citoplasma e extracelular
<b>ACTN2_HUMAN</b>	Alfa actinina 2 PE 1 SV 1	33,11	1,23	Citoplasma

<b>F6THM6_HUMAN</b>	Alfa actinina 2 PE 4 SV 1	33,11	1,6	Citoplasma
<b>K7EJH8_HUMAN</b>	Fragmento alfa actinina 4 PE 1 SV 1	194,34	5,49	Citoplasma
<b>ACTN1_HUMAN</b>	Alfa actinina 1 PE 1 SV 2	863,19	17,49	Citoplasma
<b>RACK1_HUMAN</b>	Receptor de quinase de proteína 1 C ativada	315,25	29,97	Membrana, citoplasma, núcleo
<b>TKT_HUMAN</b>	Transcetolase	403,98	13,64	Citoplasma, núcleo e extracelular
<b>H7C144_HUMAN</b>	Fragmento alfa actinina 4 PE 1 SV 1	643,43	24,27	Citoplasma e núcleo
<b>D6RFX4_HUMAN</b>	Fragmento do receptor de ativação da proteína quinase 1C	278,34	26,29	Citoplasma, membrana e núcleo

**Função biológica: Constituinte estrutural da matriz extracelular**

<b>F5GZK2_HUMAN</b>	Colágeno alfa 1 cadeia XXI PE 1 SV 2	774,6	14,75	Citoplasma e extracelular
<b>H0Y4P7_HUMAN</b>	Fragmento colágeno alfa 1 cadeia XII	169,42	13,64	Citoplasma e extracelular
<b>H0YDH6_HUMAN</b>	Fragmento de colágeno alfa 1 cadeia XXI	688,23	31,65	Citoplasma e extracelular

**Função biológica: Desconhecidas**

<b>RANDOM17159</b>	Sequência random 17159	227,47	0,14	Desconhecida
<b>RANDOM428</b>	Sequência random 428	227,47	0,27	Desconhecida
<b>RANDOM17439</b>	Sequência random 17439	52,94	0,23	Desconhecida
<b>RANDOM40232</b>	Sequência random 40232	52,94	0,29	Desconhecida
<b>F8VP51_HUMAN</b>	Proteína descaracterizada C14orf80	739,68	20,17	Desconhecida
<b>RANDOM1846</b>	Sequência random 1846	52,94	0,73	Desconhecida
<b>A0A087X0P6_HUMAN</b>	Proteína IGKV2D 29	369,45	12,75	Desconhecida
<b>A0A087WW89_HUMAN</b>	Proteína IGHV3 72	11565,13	40,59	Desconhecida
<b>F8VP50_HUMAN</b>	Fragmento de proteína descaracterizada PE 4 SV 3	402,2	13,9	Citoplasma

Tabela 5 – Relação de proteínas comuns identificadas nos grupos com diagnóstico de polpa normal e pulpíte irreversível, separadas pelo código de cada proteína no banco de dados Uniprot, média do *score* no *software ProteinLynx Global Server (PLGS)*, média de cobertura, função e localização celular.

<b>Código Uniprot</b>	<b>Descrição da proteína</b>	<b>Score</b>	<b>Média de cobertura (%)</b>	<b>Localização</b>
<b>Função biológica: Metabolismo e vias de energia</b>				
<b>TPIS_HUMAN</b>	Triosefosfato isomerase	2985,77	41,15	Citoplasma, núcleo, extracelular
<b>PGAM1_HUMAN</b>	Fosfoglicerato mutase 1	1553,32	23,52	Citoplasma, extracelular e membrana
<b>F5H793_HUMAN</b>	Fragmento L lactato desidrogenase B PE 1 SV 1	635,05	46,08	Citoplasma
<b>PGK1_HUMAN</b>	Fosfoglicerato kinase 1 PE 1 SV 3	696,25	27,18	Citoplasma
<b>F5H0C8_HUMAN</b>	Gama enolase PE 1 SV 1	939,68	19,6	Citoplasma e membrana celular
<b>H3BQ34_HUMAN</b>	Piruvato kinase PE 1 SV 1	2965,07	26,69	Citoplasma e núcleo
<b>U3KQF3_HUMAN</b>	Fragmento triosefosfato isomerase	1691,95	47,95	Citoplasma e núcleo
<b>Função biológica: Crescimento, proliferação e/ou manutenção celular</b>				
<b>H0YAB8_HUMAN</b>	Fragmento fator de crescimento transformante beta induzida proteína ig h3	6446,96	36,86	Citoplasma e extracelular
<b>Função biológica: Metabolismo de proteínas</b>				
<b>A0A0G2JRN3_HUMAN</b>	Alfa 1 antitripsina PE 1 SV 1	3471,12	27,17	Extracelular e núcleo
<b>G3V5R8_HUMAN</b>	Fragmento alfa 1 antitripsina	1840,75	21,19	Extracelular e núcleo
<b>Função biológica: Transporte</b>				
<b>D6RBJ7_HUMAN</b>	Fragmento proteína de ligação da vitamina D PE 1 SV 1	936,73	16,79	Espaço extracelular
<b>C9JB55_HUMAN</b>	Fragmento serotransferrina PE 1 SV 7	22948,73	80,26	Espaço extracelular
<b>VTDB_HUMAN</b>	Proteína de ligação da vitamina D	1138,78	22,80	Espaço extracelular
<b>HEMO_HUMAN</b>	Hemopexina	1114,12	23,30	Espaço extracelular
<b>HBD_HUMAN</b>	Subunidade hemoglobina delta PE 1 SV 2	25001,63	51,02	Citoplasma
<b>Q9BS19_HUMAN</b>	HPX proteína	797,2	18,37	Extracelular
<b>Função biológica: Processo de apoptose</b>				

<b>H0YAS8_HUMAN</b>	Fragmento clusterina PE 1 SV 1	976,21	21,02	Extracelular, citoplasma e núcleo
<b>CLUS_HUMAN</b>	Clusterina PE 1 SV 1	1263,47	17,69	Extracelular, citoplasma e núcleo
<b>H0YC35_HUMAN</b>	Fragmento clusterina PE 1 SV 1	1141,06	19,76	Extracelular, citoplasma e núcleo
<b>F8WE65_HUMAN</b>	Peptidil prolil cis trans isomerase PE 1 SV 1	982,63	37,5	Citoplasma e núcleo
<b>Função biológica: Resposta imune</b>				
<b>LAC6_HUMAN</b>	Ig lambda 6 região PE 4 SV 1	15417,89	47,64	Extracelular
<b>A1AG1_HUMAN</b>	Ácido glicoproteico alfa 1	2520,91	24,32	Extracelular
<b>PARK7_HUMAN</b>	Proteína deglicase DJ1 PE 1 SV 2	2018,91	29,1	Citoplasma, núcleo, membrana
<b>J3QRN2_HUMAN</b>	Fragmento Beta 2 glicoproteína 1	2178,89	9,39	Citoplasma
<b>J3QSA3_HUMAN</b>	Fragmento Poliubiquitin B PE 1 SV 1	3142,01	52,71	Citoplasma
<b>M0R1V7_HUMAN</b>	Fragmento Ubiquitina ribossomal 60S ribossomal da proteína	4413,64	39,68	Citoplasma
<b>A0A075B6N3_HUMAN</b>	Fragmento proteína TRBV24 1	591,68	14,78	Membrana plasmática
<b>Função biológica: Comunicação celular, sinal de transdução e adesão celular</b>				
<b>F5H7V9_HUMAN</b>	Tenascina PE 1 SV 1	4801,65	22,68	Extracelular
<b>E9PC84_HUMAN</b>	Tenascina PE 1 SV 1	7724,1	31,9	Extracelular
<b>PEBP1_HUMAN</b>	Proteína de ligação a fosfatidiletanolamina 1	615,64	34,75	Extracelular
<b>H0YGZ3_HUMAN</b>	Fragmento tenascina PE 1 SV 1	3020,97	27,15	Extracelular
<b>RABP1_HUMAN</b>	Proteína 1 de ligação ao ácido retinóico celular PE 1 SV 2	3953,16	37,59	Citoplasma
<b>H7C5W5_HUMAN</b>	Fragmento periferina	5670,55	25,5	Membrana
<b>Função biológica: Relacionado ao stress</b>				
<b>HSP72_HUMAN</b>	Proteína 2 <i>heat shock</i> 70 kDa PE 1 SV 1	1006,91	10,95	Citoplasma
<b>E9PLF4_HUMAN</b>	Fragmento <i>heat shock</i> 71 kDa PE 1 SV 1	1012,31	34,76	Citoplasma e extracelular
<b>H7BYH4_HUMAN</b>	Superóxido dismutase Cu Zn PE 1 SV 1	10677,31	63,53	Citoplasma
<b>HS71B_HUMAN</b>	Proteína 1B <i>heat shock</i> 70 kDa	1142,3	18,48	Citoplasma
<b>S10AA_HUMAN</b>	Proteína S100 A10	1872,7	23,45	Membrana e extracelular
<b>HSPB1_HUMAN</b>	Proteína beta 1 <i>heat shock</i>	477,75	20	Citoplasma e núcleo
<b>SODC_HUMAN</b>	Superoxido dismutase Cu Zn PE 1 SV 2	8664,39	68,83	Citoplasma
<b>Função biológica: Diferenciação de células nervosas</b>				
<b>MIME_HUMAN</b>	Mimecan	1765,55	34,16	Extracelular
<b>MYP0_HUMAN</b>	Proteína mielina P0	897,77	13,57	Membrana



**Função biológica: Reparo, Replicação e regulação de DNA**

<b>H0YFX9_HUMAN</b>	Fragmento histona H2A PE 1 SV 1	39946,66	36,23	Núcleo
<b>SP30L_HUMAN</b>	Subunidade do complexo histona desacetilase SAP30L	574,95		Núcleo
<b>Função biológica: Ligação ao íon cálcio</b>				
<b>Q5T987_HUMAN</b>	Fragmento Inibidor de inter tripsina alfa cadeia H2 PE 1 SV 2	324,04	9,84	Extracelular
<b>K7EPV9_HUMAN</b>	Fragmento tropomiosina alfa 4	227,18	13,02	Citoplasma
<b>D6RBL5_HUMAN</b>	Anexina ANXA5 PE 1 SV 1	1219,11	31,54	Citoplasma
<b>Q5T0I0_HUMAN</b>	Fragmento gelsolina PE 1 SV 1	542,85	17,69	Citoplasma
<b>Q5T985_HUMAN</b>	Fragmento inibidor de inter tripsina alfa cadeia H2PE 1 SV1	479,01	11,87	Citoplasma
<b>TPM4_HUMAN</b>	Tropomiosina alfa 4 PE 1 SV 3	333,73	16,93	Citoplasma, extracelular e membrana
<b>A0A0A0MS51_HUMAN</b>	Gelsolina PE 1 SV 1	2085,52	24,33	Citoplasma
<b>Função biológica: Constituinte estrutural do citoesqueleto</b>				
<b>Q5HY54_HUMAN</b>	Filamina A PE 1 SV 1	6025,7	21,55	Citoplasma
<b>FLNB_HUMAN</b>	Filamina B PE 1 SV 2	7,71	4,57	Citoplasma
<b>I3L3I0_HUMAN</b>	Fragmento actina citoplasmática 2	54545,93	35,28	Citoplasma
<b>H0Y5F3_HUMAN</b>	Fragmento filamina A PE 1 SV 1	4515,41	28,88	Citoplasma
<b>K2C3_HUMAN</b>	Queratina tipo II citoesqueletal 3 PE 1 SV 3	443,88	1,11	Citoplasma
<b>K220_HUMAN</b>	Queratina tipo II citoesqueletal 2 PE 1 SV 2	664,68	15,36	Citoplasma
<b>TBB2A_HUMAN</b>	Tubulina beta 2A PE 1 SV 1	10591,31	40,9	Citoplasma
<b>GFAP_HUMAN</b>	Proteína ácida fibrilar glial	3161,94	11,34	Citoplasma
<b>H7C5L4_HUMAN</b>	Fragmento Filamina B PE 1 SV 1	173,84	14,45	Citoplasma
<b>TBB5_HUMAN</b>	Tubulina beta PE 1 SV 2	11505,74	37,97	Citoplasma
<b>VIME_HUMAN</b>	Vimentina PE 1 SV 4	32724,61	57,92	Citoplasma
<b>A0A087WYG8_HUMAN</b>	Alfa internexina PE 1 SV 1	2787,94	12,37	Citoplasma, núcleo e extracelular
<b>Q5JVS8_HUMAN</b>	Fragmento vimentina PE 1 SV 1	22768,87	68,21	Citoplasma
<b>F8VRZ4_HUMAN</b>	Fragmento tubulina alfa 1A PE 3 SV 1	53384,97	66,96	Citoplasma
<b>TBB4B_HUMAN</b>	Tubulina beta 4B PE 1 SV 1	10877,86	17,00	Citoplasma, núcleo e extracelular
<b>FLNC_HUMAN</b>	Filamina C PE 1 SV 3	7,71	0,51	Citoplasma
<b>K2C5_HUMAN</b>	Queratina tipo II citoesqueletal 5 PE 1 SV 3	449,57	6,83	Citoplasma
<b>K2C75_HUMAN</b>	Queratina tipo II citoesqueletal 75 PE 1 SV 2	433,85	8,53	Citoplasma

**Função biológica: Constituinte estrutural da matriz extracelular**

<b>PGS1_HUMAN</b>	Biglicana PE 1 SV 2	643,18	14,47	Extracelular
<b>CO1A1_HUMAN</b>	Colágeno alfa 1 cadeia I PE 1 SV 5	512,16	9,05	Extracelular
<b>Função biológica: Desconhecido</b>				
<b>RANDOM19787</b>	Sequência random 19787	81,16	0,14	Desconhecido

Tabela 6 – Relação de proteínas comuns identificadas nos grupos com diagnóstico de polpa normal e necrosada, separadas pelo código de cada proteína no banco de dados Uniprot, média do score no software *ProteinLynx Global Server* (PLGS), média de cobertura, função e localização celular.

Código Uniprot	Descrição da proteína	Score	Média de cobertura (%)	Localização
<b>Função biológica: Metabolismo de proteínas</b>				
<b>A0A087X243_HUMAN</b>	Fragmento glutathiona S transferase	2305,76	33,33	Citoplasma, núcleo e mitocôndria
<b>Função biológica: Transporte</b>				
<b>HBAZ_HUMAN</b>	Hemoglobina zeta	5316,71	22,89	Citoplasma
<b>Função biológica: Resposta imune</b>				
<b>A0A0G2JMB2_HUMAN</b>	Fragmento Ig alfa 2 região C	5725,48	29,71	Extracelular
<b>A0A0G2JPD4_HUMAN</b>	Fragmento Ig gama 4 região C	24971,5	46,60	Membrana e extracelular
<b>LV302_HUMAN</b>	Ig lambda V III região L	539,04	7,21	Membrana e extracelular
<b>IGHA2_HUMAN</b>	Ig alfa 2 região C	4518,21	32,35	Membrana e extracelular
<b>KV304_HUMAN</b>	Ig kapa V III região T	2977,04	16,51	Membrana e extracelular
<b>IGHG3_HUMAN</b>	Ig gama 3 região C	5355,37	35,54	Membrana e extracelular
<b>Função biológica: Comunicação celular, sinal de transdução e adesão celular</b>				
<b>Q86W61_HUMAN</b>	Proteína VCAN	833,16	38,89	Membrana
<b>1433E_HUMAN</b>	Proteína epsilon 14 3 3	556,64	3,14	Citoplasma e membrana
<b>Função biológica: Relacionado ao stress</b>				
<b>HSP7C_HUMAN</b>	Proteína <i>heat shock</i> 71 kDa PE 1 SV 1	274,34	18,11	Citoplasma, núcleo e membrana
<b>PDIA6_HUMAN</b>	Proteína disulfeto isomerase A6 PE 1 SV 1	2421,82	10,91	Retículo endoplasmático e membrana
<b>E9PNE6_HUMAN</b>	Proteína <i>heat shock</i> cognate 71 kDa PE 1 SV 1	844,08	8,8	Citoplasma, núcleo e membrana
<b>E9PN25_HUMAN</b>	Fragmento <i>heat shock</i> 71 kDa PE 1 SV 1	842,49	26,13	Citoplasma, núcleo e membrana
<b>Função biológica: Reparo, Replicação e regulação de DNA</b>				

<b>H2B1D_HUMAN</b>	Histona H2B tipo 1 D PE 1 SV 2	1860,36	15,08	Núcleo
<b>CENPF_HUMAN</b>	Proteína centromérica F	52,94	0,12	Citoplasma e núcleo
<b>H2B1K_HUMAN</b>	Histona H2B tipo 1 K	15768,71	14,29	Núcleo
<b>H2B1N_HUMAN</b>	Histona H2B tipo 1 N	1783,77	26,98	Núcleo
<b>Função biológica: Ligado ao íon cálcio</b>				
<b>E9PF17_HUMAN</b>	Versican	859,26	14,19	Citoplasma
<b>Q5T3N0_HUMAN</b>	Fragmento anexina A1 PE 1 SV 1	274,66	48,7	Citoplasma
<b>D6RGZ6_HUMAN</b>	Fragmento versican PE 1 SV 1	855,19	14,12	Citoplasma
<b>H0YI43_HUMAN</b>	Fragmento polipeptídeo de miosina 6	1779,97	28,92	Citoplasma e membrana
<b>F6U495_HUMAN</b>	Fibrilina 1 PE 1 SV 1	641,57	27,48	Extracelular
<b>Função biológica: Constituinte estrutural do citoesqueleto</b>				
<b>TBA1A_HUMAN</b>	Tubulina alfa 1A	10204,83	34,86	Citoplasma
<b>V9GZ54_HUMAN</b>	Fragmento moesin	1551,17	35,92	Citoplasma e membrana
<b>DESM_HUMAN</b>	Desmina	856,21	20,64	Citoplasma
<b>MOES_HUMAN</b>	Moesin PE 1 SV 3	1614,22	7,97	Citoplasma
<b>RLA1_HUMAN</b>	Proteína ribossomal ácida 60S PE 1 SV 1	872,87	44,73	Ribossomo
<b>CRCC2_HUMAN</b>	Putativo ciliar radicular da proteína em dupla espiral 2	52,94	0,23	Citoplasma
<b>Função biológica: Constituinte estrutural da matriz extracelular</b>				
<b>H0Y9D7_HUMAN</b>	Fragmento de fator de crescimento de transformação induzida por proteína beta Ig h3	458,81	31,44	Extracelular
<b>E7ENL6_HUMAN</b>	Colágeno alfa 3 cadeia VI	617,32	17,82	Extracelular
<b>CO6A3_HUMAN</b>	Colágeno alfa 3 cadeia VI	625,54	16,35	Extracelular
<b>CO6A2_HUMAN</b>	Colágeno alfa 2 cadeia VI PE 1 SV 4	446,26	7,75	Extracelular
<b>Função biológica: Desconhecido</b>				
<b>RANDOM15108</b>	Sequência random 15108	52,94	0,08	Desconhecido
<b>A0A0B4J269_HUMAN</b>	Proteína descaracterizada PE 1 SV 1	639,91	9,53	Desconhecido
<b>POTEF_HUMAN</b>	Membro da família POTE domínio F	21709,45	10,55	Citoplasma e extracelular
<b>POTEE_HUMAN</b>	Membro da família POTE domínio E	13452,67	12,7	Extracelular

Tabela 7 – Relação de proteínas comuns identificadas nos grupos com diagnóstico de pulpíte irreversível e necrose pulpar, separadas pelo código de cada proteína no banco de dados Uniprot, média do score no software *ProteinLynx Global Server* (PLGS), média de cobertura, função e localização celular.

Código Uniprot	Descrição da proteína	Score	Média de cobertura (%)	Localização
<b>Função biológica: Metabolismo e vias de energia</b>				
<b>G3XAL0_HUMAN</b>	Malato desidrogenase MDH2 PE 1 SV 1	386,12	10,39	Membrana, mitocôndria e núcleo
<b>A0A0B4J1R6_HUMAN</b>	Transcetolase	138,91	18,71	Citoplasma, extracelular e núcleo
<b>Função biológica: Transporte</b>				
<b>K7ERX7_HUMAN</b>	Fragmento mitocondrial da subunidade alfa da ATP sintase	1552,56	27,07	Mitocôndria
<b>Função biológica: Processo de apoptose</b>				
<b>LDHA_HUMAN</b>	L lactato desidrogenase A PE 1 SV 2	332,36	15,51	Citoplasma
<b>ACTN4_HUMAN</b>	Alfa actinina 4 PE 1 SV 2	497,08	13,28	Citoplasma
<b>Função biológica: Resposta imune</b>				
<b>DEF3_HUMAN</b>	Defensina neutrofílica 3	24919,23	19,15	Extracelular
<b>A0A087WUA0_HUMAN</b>	Fibrinogênio alfa PE 1 SV 1	4663,81	9,57	Extracelular
<b>A0A0A0MS07_HUMAN</b>	Ig gama 1 região C PE 1 SV 1	10547,05	50,51	Membrana e extracelular
<b>C9JPQ9_HUMAN</b>	Fragmento fibrinogênio gama PE 1 SV 1	8112,46	41,77	Extracelular
<b>C9JEU5_HUMAN</b>	Fibrinogênio gama PE 1 SV 1	8409,27	21,93	Extracelular
<b>D6REL8_HUMAN</b>	Fibrinogênio beta PE 1 SV 1	3360,12	24,52	Extracelular
<b>DEF1_HUMAN</b>	Defensina neutrofílica 1 PE 1 SV 1	24919,23	19,15	Extracelular
<b>FIBB_HUMAN</b>	Fibrinogênio beta PE 1 SV 2	3852,92	30,85	Extracelular
<b>A0A075B6K9_HUMAN</b>	Fragmento Ig lambda 2 região C PE 4 SV 1	16534,03	51,25	Membrana e extracelular
<b>FIBA_HUMAN</b>	Fibrinogênio alfa PE 1 SV 2	4488,92	9,93	Extracelular
<b>Função biológica: Comunicação celular, sinal de transdução e adesão celular</b>				
<b>F8W835_HUMAN</b>	Fragmento periferina PE 1 SV 2	232,38	20,29	Membrana
<b>Função biológica: Relacionado ao stress</b>				

<b>HS71L_HUMAN</b>	<i>Heat shock 70 kDa like</i> proteína 1 PE 1 SV 2	765,45	9,2	Citoplasma, núcleo e membrana
<b>Q53FA3_HUMAN</b>	Fragmento <i>Heat shock 70 kDa like</i> protein 1 PE 1 SV 1	293,21	6,4	Citoplasma, núcleo e membrana
<b>K7EN27_HUMAN</b>	Fragmento proteína deglicase DJ 1 PE 1 SV 1	1569,86	20,94	Membrana, citoplasma, núcleo e mitocôndria

**Função biológica: Reparo, Replicação e regulação de DNA**

<b>H2B2F_HUMAN</b>	Histona H2B tipo 2 F PE 1 SV 3	1940,16	15,08	Núcleo
<b>Função biológica: Ligação ao íon cálcio</b>				
<b>H0YC77_HUMAN</b>	Fragmento anexina ANXA6 PE 1 SV 1	443,98	27,47	Citoplasma
<b>H0YJ11_HUMAN</b>	Fragmento alfa actinina 1 PE 1 SV 1	740,86	23,19	Citoplasma e membrana
<b>GRP78_HUMAN</b>	Proteína regulada pela glicose de 78 kDa PE 1 SV 2	2070,24	25,06	Citoplasma
<b>E5RJF5_HUMAN</b>	Fragmento anexina ANXA6 PE 1 SV 7	1481,88	35,53	Citoplasma
<b>B7Z6Z4_HUMAN</b>	Polipeptídeo leve de miosina 6	1403,61	23,53	Citoplasma e membrana

**Função biológica: Constituinte estrutural do citoesqueleto**

<b>K2C6B_HUMAN</b>	Queratina citoesquelética tipo II PE 1 SV 5	8,48	14,18	Citoplasma
<b>F8VUG2_HUMAN</b>	Queratina citoesquelética 8 tipo II PE 1 SV 1	479,82	6,41	Citoplasma
<b>K2C78_HUMAN</b>	Queratina citoesquelética 78 tipo II PE 2 SV 2	409,17	12,5	Citoplasma
<b>V9GZ17_HUMAN</b>	Fragmento tubulina alfa 8 PE 1 SV 1	365,77	16,36	Citoplasma
<b>1433Z_HUMAN</b>	Proteína zeta delta 14 3 3 PE 1 SV 1	821,26	26,53	Citoplasma
<b>NFL_HUMAN</b>	Polipeptídeo de neurofilamento de cadeia leve PE 1 SV 3	717,29	16,57	Citoplasma
<b>NFH_HUMAN</b>	Polipeptídeo de neurofilamento pesado PE 1 SV 4	690,74	5,56	Citoplasma
<b>TBA3E_HUMAN</b>	Tubulina alfa 3E PE 1 SV 2	2282,73	28,67	Citoplasma
<b>B0YJC4_HUMAN</b>	Vimentina PE 1 SV 1	14746,71	33,00	Citoplasma

**Função biológica: Organização da matriz extracelular**

<b>PRDX4_HUMAN</b>	Peroxiredoxina 4 PE 1 SV 1	1835,81	37,64	Citoplasma e extracelular
<b>H7C3T4_HUMAN</b>	Fragmento Peroxiredoxina 4 PE 1 SV 1	7126,19	27,64	Citoplasma e extracelular

Tabela 8 – Relação de proteínas comuns identificadas nos grupos dos 3 diferentes diagnósticos - polpa normal, pulpíte irreversível e necrose pulpar, separadas pelo código de cada proteína no banco de dados Uniprot, média do score no software *ProteinLynx Global Server* (PLGS), média de cobertura, função e localização celular.

Código Uniprot	Descrição da proteína	Score	Média de cobertura (%)	Localização
<b>Função biológica: Metabolismo e vias de energia</b>				
H3BU13_HUMAN	Fragmento piruvato kinase PKM	2096,83	18,29	Citoplasma e núcleo
ENO1_YEAST	Enolase 1 OS PE 1 SV 3	2142,98	30,18	Citoplasma
K7EM90_HUMAN	Fragmento alfa enolase	2090,27	29,06	Citoplasma
ENOB_HUMAN	Beta enolase PE 1 SV 5	32,11	10,75	Citoplasma
F5H1C3_HUMAN	Fragmento gama enolase	1848,38	25,73	Citoplasma e membrana celular
H3BR70_HUMAN	Piruvato kinase PE 1 SV 1	707,25	19,95	Citoplasma e núcleo
B4DNK4_HUMAN	Piruvato kinase PKM PE 1 SV 1	2706,82	16,90	Citoplasma e núcleo
ENOA_HUMAN	Alfa enolase PE 1 SV 2	2392,34	32,15	Citoplasma
H3BTN5_HUMAN	Fragmento piruvato kinase PKM PE 1 SV 1	150,42	24,84	Citoplasma e núcleo
<b>Função biológica: Regulação de nucleobases, nucleosídeo e nucleotídeos. Metabolismo do ácido nucleico</b>				
A6NIW5_HUMAN	Peroxirredoxina isoforma 2 PE 1 SV 2	1169,24	38,97	Citoplasma e extracelular
Q8IWY7_HUMAN	Tau tubulina quinase PE 1 SV 1	62,3	4,74	Citoplasma
<b>Função biológica: Transporte</b>				
A0A087WWT3_HUMAN	Albumina sérica PE 1 SV 1	32316,21	71,52	Extracelular
H7C5E8_HUMAN	Fragmento serotransferrina PE 1 SV 1	1207,48	34,49	Extracelular
HBB_HUMAN	Hemoglobina beta PE 1 SV 2	90733,28	89,95	Citoplasma
ALBU_HUMAN	Albumina sérica PE 1 SV 2	43939,69	74,38	Extracelular
TRFE_HUMAN	Serotransferrina PE 1 SV 3	2575,13	55,12	Extracelular
C9JVG0_HUMAN	Fragmento serotransferrina TF PE 1 SV 1	918,93	69,48	Extracelular
G3V1N2_HUMAN	HCG1745306 isoforma CRAa PE 1 SV 1	19489,65	64,24	Extracelular
E9PEW8_HUMAN	Fragmento hemoglobina delta PE 1 SV 1	8558,12	53,04	Citoplasma
F8W6P5_HUMAN	Fragmento hemoglobina beta PE 1 SV 1	71640,49	75,93	Citoplasma
C9JKR2_HUMAN	Albumina isoforma CRA k PE 1 SV 1	5181,6	70,74	Extracelular
H0YH81_HUMAN	Fragmento da subunidade beta da ATP sintase	628,32	14,91	Mitocôndria
H0YA55_HUMAN	Fragmento da albumina sérica PE 1 SV 1	5459,57	75,77	Extracelular

<b>K7EQH4_HUMAN</b>	Fragmento mitocondrial da subunidade alfa da ATP sintase	1233,98	33,33	Mitocôndria
<b>H7C013_HUMAN</b>	Fragmento abumina sérica PE 1 SV 1	24377,49	61,68	Extracelular
<b>ATPA_HUMAN</b>	ATP sintase subunidade alfa mitocondrial PE 1 SV 1	2998,02	14,46	Mitocôndria

**Função biológica: Processo de apoptose**

<b>A6NIW5_HUMAN</b>	Peroxirredoxina 2 isoforma CRAa PE 1 SV 2	1169,24	38,97	Citoplasma e extracelular
<b>LEG1_HUMAN</b>	Galectina 1 PE 1 SV 2	2398,34	39,42	Citoplasma, extracelular e núcleo

**Função biológica: Resposta imune**

<b>A0A075B6K8_HUMAN</b>	Fragmento Ig lambda 1 região C PE 4 SV 1	12948,84	38,30	Membrana e extracelular
<b>KV302_HUMAN</b>	Ig kappa região V III PE 1 SV 1	1281,45	16,51	Membrana e extracelular
<b>IGHG2_HUMAN</b>	Ig gamma 2 região C PE 1 SV 2	20989,22	54,95	Membrana e extracelular
<b>S4R460_HUMAN</b>	Proteína IGHV3OR16 9	8365,47	29,79	Membrana
<b>LAC1_HUMAN</b>	Ig lambda 1 região C PE 1 SV 1	8095,02	31,13	Membrana e extracelular
<b>IGHG1_HUMAN</b>	Ig gamma 1 região C PE 1 SV 1	31845,76	67,37	Membrana e extracelular
<b>A0A075B6N8_HUMAN</b>	Fragmento Ig gama 3 região C PE 1 SV 1	17531,45	35,54	Membrana e extracelular
<b>KV305_HUMAN</b>	Ig kappa VIII região W PE 1 SV 1	1671,67	16,51	Membrana e extracelular
<b>A0A0A0MRQ5_HUMAN</b>	Peroxirredoxina 1 PE 1 SV 1	6209,41	55,37	Citoplasma
<b>A0A0G2JN06_HUMAN</b>	Fragmento Ig gamma 2 região C PE 1 SV 2	20989,22	62,42	Membrana e extracelular
<b>A0A075B6L0_HUMAN</b>	Fragmento Ig lambda 3 região C PE 1 SV 2	5120,27	46,23	Membrana e extracelular
<b>IGHA1_HUMAN</b>	Ig alfa 1 região C PE 1 SV 2	5947,33	41,29	embrana e extracelular
<b>IGHG4_HUMAN</b>	Ig gama 4 região C PE 1 SV 1	8078,53	45,31	Membrana e extracelular
<b>IGKC_HUMAN</b>	Ig kapa região C PE 1 SV 1	34642	80,19	Membrana e extracelular
<b>LAC3_HUMAN</b>	Ig lambda 3 região C PE 1 SV 1	19949,05	39,15	Membrana e extracelular
<b>A0A0A0MSIO_HUMAN</b>	Fragmento peroxirredoxina 1 PE 1 SV 1	515,91	43,44	Citoplasma
<b>KV307_HUMAN</b>	Ig kapa VIII região G	2714,54	40,37	Membrana e extracelular
<b>IGLL5_HUMAN</b>	Ig lambda <i>like</i> polipeptídio 5 PE 2 SV 2	5556,66	32,09	Membrana e extracelular

**Função biológica: Comunicação celular, sinal de transdução e adesão celular**

<b>BGH3_HUMAN</b>	Fator transformador de crescimento beta proteína induzida h3 ig	682,04	27,41	Extracelular
<b>B0YJC5_HUMAN</b>	Vimentin OS <i>Homo sapiens</i> GN VIM PE 1 SV 1	11957,57	68,42	Citoplasma
<b>F8WBR5_HUMAN</b>	Calmodulin OS <i>Homo sapiens</i> GN CALM2 PE 1 SV 1	2139,27	36,92	Citoplasma
<b>H0Y8L3_HUMAN</b>	Fragmento fator transformador de crescimento beta proteína induzida h3 ig	639,46	31,63	Extracelular

**Função biológica: Resposta ao stress**



<b>HSP76_HUMAN</b>	Proteína 6 <i>Heat shock</i> 70 kDa PE 1 SV 2	803,18	12,05	Citoplasma
<b>E9PI65_HUMAN</b>	Fragmento <i>Heat shock</i> 71 kDa PE 1 SV 1	958,23	28,92	Citoplasma
<b>PRDX2_HUMAN</b>	Peroxirredoxina 2 PE 1 SV 5	1435,9	39,22	Citoplasma
<b>APOA1_HUMAN</b>	Apolipoproteína A I	389,16	56,84	Extracelular
<b>HS71A_HUMAN</b>	Proteína 1A <i>heat shock</i> 70 kDa PE 1 SV 1	876,53	17,68	Citoplasma
<b>Função biológica: Reparo, replicação e regulação de DNA</b>				
<b>H4_HUMAN</b>	Histona H4	38858,35	33,33	Núcleo
<b>H2A1J_HUMAN</b>	Histona H2A tipo 1 J	2853,69	31,64	Núcleo
<b>A0A087WVQ9_HUMAN</b>	Fator de alongação 1 alfa 1	3199,43	13,94	Citoplasma e núcleo
<b>H2B1C_HUMAN</b>	Histona H2B tipo 1 C	2567,82	20,10	Núcleo
<b>K7EMV3_HUMAN</b>	Histona H3 OS H3F3B PE 1 SV 1	15678,23	21,37	Núcleo
<b>Q5TEC6_HUMAN</b>	Histona H3 HIST2H3PS2 PE 1 SV 1	11532,67	32,35	Núcleo
<b>H2A1H_HUMAN</b>	Histona H2A tipo 1 H	4208,27	34,22	Núcleo
<b>Função biológica: Ligado ao íon cálcio</b>				
<b>D6RCN3_HUMAN</b>	Anexina A5 PE 1 SV 1	12902,91	37,62	Citoplasma e extracelular
<b>Q5T3N1_HUMAN</b>	Fragmento anexina PE 1 SV 1	11933,72	39,21	Citoplasma e extracelular
<b>H0YND0_HUMAN</b>	Fragmento fibrilina 1 PE 1 SV 1	288,13	23,56	Citoplasma
<b>H0YLE2_HUMAN</b>	Fragmento anexina A2 PE 1 SV 1	9865,76	38,03	Citoplasma e extracelular
<b>ANXA6_HUMAN</b>	Anexina A6	2341,68	23,25	Citoplasma e extracelular
<b>E5RK69_HUMAN</b>	Anexina PE 1 SV 1	563,47	22,39	Citoplasma e extracelular
<b>ANXA2_HUMAN</b>	Anexina A2 PE 1 SV 2	12969,35	39,26	Citoplasma e extracelular
<b>A0A087WV40_HUMAN</b>	Fibrilina 2 PE 1 SV 1	495,57	20,96	Extracelular
<b>FBN1_HUMAN</b>	Fibrilina 1 PE 1 SV 3	882,03	20,35	Extracelular
<b>H0YMD9_HUMAN</b>	Fragmento anexina A2 PE 1 SV 1	1461,49	78,46	Citoplasma e extracelular
<b>E7EMC6_HUMAN</b>	Anexina A6 PE 1 SV 1	833,08	28,94	Citoplasma e extracelular
<b>ANXA1_HUMAN</b>	Anexina A1 PE 1 SV 2	4630,34	33,52	Citoplasma e extracelular
<b>H0YMM1_HUMAN</b>	Fragmento anexina PE 1 SV 1	12873,62	64,76	Citoplasma e extracelular
<b>A0A087WYV8_HUMAN</b>	Fibrilina 2 PE 1 SV 1	511,75	10,17	Extracelular
<b>E9PHT9_HUMAN</b>	Anexina A5 PE 1 SV 1	16313,68	34,63	Citoplasma e extracelular
<b>ANXA5_HUMAN</b>	Anexina A5 PE 1 SV 2	16563,36	28,96	Citoplasma e extracelular
<b>F8VPF3_HUMAN</b>	Fragmento miosina cadeia leve polipeptídio 6 PE 1 SV 1	1403,61	28,65	Citoplasma e extracelular
<b>H0YKV8_HUMAN</b>	Fragmento anexina A2 PE 1 SV 1	1639,66	76,95	Citoplasma e extracelular
<b>Função biológica: Constituinte estrutural do citoesqueleto</b>				
<b>F8W0C6_HUMAN</b>	Fragmento Queratina citoesquelética 5 tipo II	1063,65	18,44	Citoplasma
<b>F8VVB9_HUMAN</b>	Fragmento tubulina alfa 1B PE 1 SV 7	9625	40,57	Citoplasma
<b>ACTB_HUMAN</b>	Actina citoplasmática 1 PE 1 SV 1	38573,19	37,95	Citoplasma

<b>K2C8_HUMAN</b>	Queratina citoesquelética 8 tipo II	368,19	7,45	Citoplasma
<b>TBB4A_HUMAN</b>	Tubulina beta 4A PE 1 SV 2	558,09	26,35	Citoplasma
<b>Q60FE5_HUMAN</b>	Filamina A	2561,75	29,35	Citoplasma
<b>Q5JP53_HUMAN</b>	Tubulina beta PE 1 SV 1	5328,85	32,45	Citoplasma
<b>H0Y5C6_HUMAN</b>	Fragmento filamina A	318,85	22,77	Citoplasma
<b>G3P_HUMAN</b>	Fosfato desidrogenase gliceraldeído 3	3435,21	35,82	Citoplasma, membrana e núcleo
<b>TBB2B_HUMAN</b>	Tubulina beta 2B PE 1 SV 1	316,13	28,42	Citoplasma
<b>H7C2E7_HUMAN</b>	Fragmento Filamina A PE 1 SV 1	2060,3	40,24	Citoplasma
<b>I3L1U9_HUMAN</b>	Fragmento actina citoplasmática PE 1 SV 1	40088,59	32,4	Citoplasma
<b>G3V2A3_HUMAN</b>	Fragmento tubulina beta 3 PE 1 SV 1	4277,13	13,68	Citoplasma
<b>E7EUT5_HUMAN</b>	Fosfato desidrogenase gliceraldeído 3 PE 1 SV 1	3384,48	32,47	Citoplasma, membrana e núcleo
<b>PROF1_HUMAN</b>	Profilina 1	384,3	34,40	Citoplasma
<b>TBA1C_HUMAN</b>	Tubulina alfa 1C PE 1 SV 1	6474,7	38,88	Citoplasma
<b>E7ESK7_HUMAN</b>	Fragmento 14 3 3 proteína zeta delta PE 1 SV 1	2234,78	23,36	Citoplasma
<b>E7EMV2_HUMAN</b>	Polipeptídeo médio de neurofilamento PE 1 SV 1	703,06	5,73	Citoplasma
<b>E9PLJ3_HUMAN</b>	Fragmento cofilina 1 PE 1 SV 1	498,82	52,84	Citoplasma
<b>F8VRK0_HUMAN</b>	Fragmento tubulina alfa 1B PE 1 SV 1	5214,4	52,85	Citoplasma
<b>ACTC_HUMAN</b>	Actina alfa do músculo cardíaco 1	7827,25	32,76	Citoplasma
<b>B0AZS6_HUMAN</b>	14 3 3 proteína zeta delta PE 1 SV 1	2605,47	41,27	Citoplasma
<b>TBA1B_HUMAN</b>	Tubulina alfa 1B PE 1 SV 1	10309,24	33,04	Citoplasma
<b>G5E9R0_HUMAN</b>	Actina citoplasmática 1	23528,18	48,62	Citoplasma
<b>F8VQQ4_HUMAN</b>	Fragmento tubulina alfa 1A PE 1 SV 1	9474,7	31,33	Citoplasma
<b>ACTG_HUMAN</b>	Actina citoplasmática 2 PE 1 SV 1	38573,19	30,62	Citoplasma
<b>Q5ST81_HUMAN</b>	Tubulina beta PE 1 SV 1	5297,42	22,58	Citoplasma
<b>Função biológica: Constituinte da matriz extracelular</b>				
<b>LUM_HUMAN</b>	Lumican PE 1 SV 2	1115,53	32,18	Extracelular
<b>A0A087X0S5_HUMAN</b>	Colágeno alfa 1 cadeia VI	534,01	20,12	Extracelular
<b>A0A087WTA8_HUMAN</b>	Colágeno alfa 2 cadeia I PE 1 SV 1	722,11	6,01	Extracelular

## 9.3 ANEXO C – PUBLICAÇÕES DURANTE O MESTRADO

### 9.3.1 Publicação de artigo para revista *Brazilian Journal of Periodontology*



## PATIENTS' PERCEPTIONS TOWARDS DIABETES MELLITUS AND ORAL HEALTH: A CROSS-SECTIONAL STUDY

Percepções de pacientes sobre a relação entre diabetes mellitus e saúde oral: um estudo transversal

Evelyn Mikaela Kogawa<sup>1</sup>, Poliana Amanda Oliveira Silva<sup>2</sup>, Daniela Corrêa Grisi<sup>3</sup>, Taia Maria Berto Rezende<sup>4</sup>, Daniela Leite Bernardi<sup>5</sup>, Denise Pinheiro Falcão<sup>6</sup>, Rivadávio Fernandes Batista de Amorim<sup>7</sup>

<sup>1</sup> Assistant Professor of Dental Prosthesis, Department of Prosthesis, School of Dentistry, Catholic University of Brasília (UCB-DF), Brasília, Brazil.

<sup>2</sup> Graduate Student, School of Dentistry, Catholic University of Brasília (UCB-DF), Brasília, Brazil.

<sup>3</sup> Assistant Professor of Periodontics, Department of Periodontics, School of Dentistry, Catholic University of Brasília (UCB-DF), Brasília, Brazil.

<sup>4</sup> Assistant Professor of Endodontics, Department of Endodontics, School of Dentistry, Catholic University of Brasília (UCB-DF), Brasília, Brazil.

<sup>5</sup> Pharmacist, School of Pharmacy, University of São Paulo (USP-SP), São Paulo-SP, Brazil.

<sup>6</sup> Visiting Professor, Post-Graduation Program of Medical Sciences, University of Brasília (UnB-DF), Brasília, Brazil.

<sup>7</sup> Postdoctoral Research Fellow, Laboratory of Neuromodulation & Center for Clinical Research Learning, Harvard Medical School (HMS), Charlestown-Massachusetts, USA.

Recebimento: 12/11/15 - Correção: 14/02/16 - Aceite: 22/04/16

### ABSTRACT

**Purpose:** To evaluate the knowledge of diabetic patients towards the connection between diabetes mellitus (DM) and oral diseases. Oral status was also assessed in order to evaluate the correlation among patients' perception and their oral health.

**Material and Methods:** A sample of 132 diabetic subjects answered a questionnaire containing 12 questions addressing their knowledge, attitudes and practices related to oral health. Oral examination assessed the presence of cavity carious lesions, residual roots, dental biofilm, calculus, gingivitis, tooth mobility and gingival recession.

**Results:** Fifty-four percent of the sample had never been instructed by their health professionals that DM could cause oral diseases. However, 66% presumed being more vulnerable to develop oral illnesses and 57.5% answered that they assumed having no oral disturbances at that moment. In contrast, intraoral clinical examination showed that 99% presented at least one oral injury such as caries lesions, plaque/calculus, gingival inflammation, tooth mobility, residual root and xerostomia.

**Conclusions:** Health care professionals usually neglect oral status in diabetic patients. Above all, there is a huge gap between patients' perceptions towards oral health and their real oral status. This study highlights the need of developing new models of prevention that properly address the important clinical relation between oral diseases and DM.

**KEYWORDS:** Diabetes mellitus, oral health, oral diseases, diabetes-related complications. R Periodontia 2016; 26: 07-13.

### INTRODUCTION

The World Health Organization (WHO) and the International Diabetes Federation (IDF) consider Diabetes Mellitus (DM) as a global epidemic disease. Worldwide, it is estimated that 382 million people have diabetes and the current trend indicates that this number will reach 600 million by 2035 (IDF, 2012). Moreover, a considerable number of patients with type 2 diabetes remains undiagnosed for a long period, being unaware of the long-term co-morbidities related with the disease. Due to its chronic nature, several

complications need specialized care. Hence, DM represents a relevant public health concern in many countries (IDF, 2012).

DM is a heterogeneous group of metabolic disorders with multiple etiologies. Not only total or relative insulin deficiency are observed but also insulin resistance on target tissues. Dysregulated immune system, followed by abnormalities in the metabolism of glucose, carbohydrates, lipids and proteins, usually associated with chronic hyperglycemia, play a key role on the pathogenesis of diabetes. In DM progression, the risk of systemic and oral complications increases and is even higher in subjects

### 9.3.2 Submissão de artigo para revista Clinical Oral Investigation

#### Systemic health conditions of diabetic patients and their correlation with apical periodontitis

Poliana Amanda Oliveira Silva<sup>1,2</sup>, Stella Maris de Freitas Lima<sup>2,3</sup>, Jeaser Alves de Almeida<sup>4</sup>, Daniela Corrêa Grisi<sup>3</sup>, Evelyn Mikaela Kogawa<sup>3</sup>, Octávio Luiz Franco<sup>2,5</sup>, Taia Maria Berto Rezende<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, Distrito Federal, Brazil; <sup>2</sup> Centro de Análises Proteômicas e Bioquímicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília, Brasília, Distrito Federal, Brazil; <sup>3</sup> Curso de Odontologia, Universidade Católica de Brasília, Brasília, Distrito Federal, Brazil; <sup>4</sup> Curso de Educação Física da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Mato Grosso do Sul, Brazil; <sup>5</sup> S-Inova Biotech, Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande, MS, Brazil

**Running title:** Diabetes Mellitus and apical periodontitis

**Corresponding author data:**

**Name:** Taia Maria Berto Rezende

**Full postal address:** Universidade Católica de Brasília, Pós-graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia

SGAN 916N – Av. W5 – Campus II – Modulo C, room C-218

Brasília-DF, Brazil

Zip code: 70.790-160

**Fone:** + 55-61-8134-9001

**Fax:** + 55-61-3347-4797

**e-mail:** taiambr@gmail.com; **Secondary e-mail:** taia@ucb.br