

Identificação na saliva de biomarcadores de suscetibilidade à cárie dentária

Carolina Lourenço, Maria José Correia, Marlene Barros, Nuno Rosa

Departamento de Ciências da Saúde, Universidade Católica Portuguesa, Viseu, Portugal

36

Introdução

A cárie dentária é uma doença crónica de etiologia multi-fatorial, causada pela complexa interação entre os ácidos produzidos pela placa bacteriana, os hidratos de carbono fermentáveis provenientes da dieta e fatores do hospedeiro que incluem a saliva. Dada a elevada prevalência da doença a nível mundial e uma base científica que suporta a existência de fatores de suscetibilidade individual para o desenvolvimento da mesma, urge a necessidade de desenvolver meios de identificação precoce de suscetibilidade para que medidas preventivas eficazes possam ser tomadas e adaptadas a cada indivíduo. Assim, com este estudo objetivou-se verificar a relação existente entre a presença de determinadas proteínas salivares e a presença de cárie nos indivíduos analisados, com possível identificação de potenciais marcadores de suscetibilidade à doença.

Objetivos

- Catologação das proteínas humanas e microbianas da cavidade oral de pacientes com cárie dentária e anotação manual de informações consideradas relevantes para a interpretação de dados de proteómica nesta patologia;
- Atualização do OralCard com a informação levantada no decorrer do trabalho;
- Avaliação das principais diferenças entre o proteoma salivar em cárie e o mesmo em indivíduos saudáveis;
- Avaliação das implicações funcionais das proteínas humanas orais identificadas no proteoma salivar de cárie dentária;
- Avaliação da interação das proteínas salivares presentes em cárie com os restantes componentes microbianos e proteicos presentes na cavidade oral e influentes no mecanismo de cárie dentária;
- Revisão e proposta de proteínas que, de acordo com as suas funções e dados de quantificação em cárie dentária, representem potencial de biomarcadores da doença.

Metodologia

Pesquisa Bibliográfica e seleção dos estudos

(PubMed, Lilacs e Scielo)

- estudos observacionais controlados de comparação proteómica de indivíduos com experiência de cárie (CPO=0) e indivíduos sem experiência de cárie (CPO>0);
- estudos observacionais controlados de comparação proteómica de indivíduos de acordo com o seu nível de CPO

“dental caries”; “caries susceptibility”; “salivary proteins”; “biomarkers”; “proteomics”

Resultados

Fig. 1 Foi realizada uma pesquisa bibliográfica eletrónica com recurso a ferramentas de pesquisa como o portal PubMed Medline, ISI Web of Science e Scielo, usando como expressões de pesquisa os seguintes Termos Mesh de forma combinada: “dental caries”; “caries susceptibility”; “salivary proteins”; “biomarkers”; “proteomics”.

Authors	Title	Year	Published In
Bielawska, A	Mucin levels in saliva of adolescents with dental caries	2014	Medical Science Monitor
Bielawska, A; Jablonski, R	The assessment of sIgA, histatin-5, and lactoperoxidase levels in saliva of adolescents with dental caries	2014	Medical Science Monitor
Hashizume-takizawa, T; Shin...	Establishment of a convenient sandwich-ELISA for direct quantification of glucosyltransferase-1: application for dual di...	2014	Monoclonal Antibodies in Immunodiagnosis and Immunotherapy
Hegde, MN; Hegde, ND; Ash...	Biochemical indicators of dental caries in saliva: an in vivo study	2014	Caries Research
Hong, SW; Seo, D; Baik, JE; ...	Differential profiles of salivary proteins with affinity to Streptococcus mutans lipoteichoic acid in caries-free and carie...	2014	Molecular Oral Microbiology
Zhao, A; Blackburn, C; Chin, ...	Soluble toll like receptor 2 (TLR-2) is increased in saliva of children with dental caries	2014	BMC Oral Health

Tabela 1. A análise dos artigos selecionados permitiu a atualização da base de dados “OralOma de Cárie Dentária” originando 190 novas entradas. Cada proteína identificada foi associada a um código universal de identificação (código UniProt) e caracterizada de acordo com os parâmetros descritos na tabela, respeitantes a: organismo produtor; origem da amostra recolhida; associação a saúde e/ou cárie dentária; variação da quantidade de proteína na doença em relação ao controlo saudável (Regulation); características do(s) indivíduo(s) dador(es) da amostra; métodos de amostragem e análise; tipo de estudo efetuado; potencialidade como biomarcador de suscetibilidade à cárie dentária e código do artigo de referência.

UniProt ID	Gene name	Name	Organism	Parotid	Parotid Exosome	SMASL	Minor	Whole Saliva	Crevicular Fluid	Mucosa	Tongue	Biofilm	In Vitro	Health	Disease (OMIM ID)	Disease (MeSH)	Regulation	Age group	Gender	Social Habits	Methods of Sampling	Methods of Analysis	Type of Study	PTM	Biomarker	Citation (NCBI ID)
P04280	PRP-1	Proline-rich protein-1	Homo sapiens					x							Dental Caries 08003731	na	17-24	MF			Unstimula Electroghy Proteomics				32459324	
P08027	gPII	Glucosyltransferase II	S. mutans										x		Dental Caries 08003731	+	20-27	MF			Oral samp Enzyme II Non-proteomics			x	24746149	
P13001	gPII	Glucosyltransferase II	S. sobrinus										x		Dental Caries 08003731	+	20-27	MF			Oral samp Enzyme II Non-proteomics			x	24746149	
P00451	SOD-1	Superoxide dismutase	Homo sapiens					x						x	Dental Caries 08003731	1,84	25-50	MF			Unstimula Atomic nit Non-proteomics				24504381	
P03125	TNFA	Tumor necrosis factor	Homo sapiens					x						x	Dental Caries 08003731	4,99	18	MF			Unstimula Enzyme II Non-proteomics				23311795	

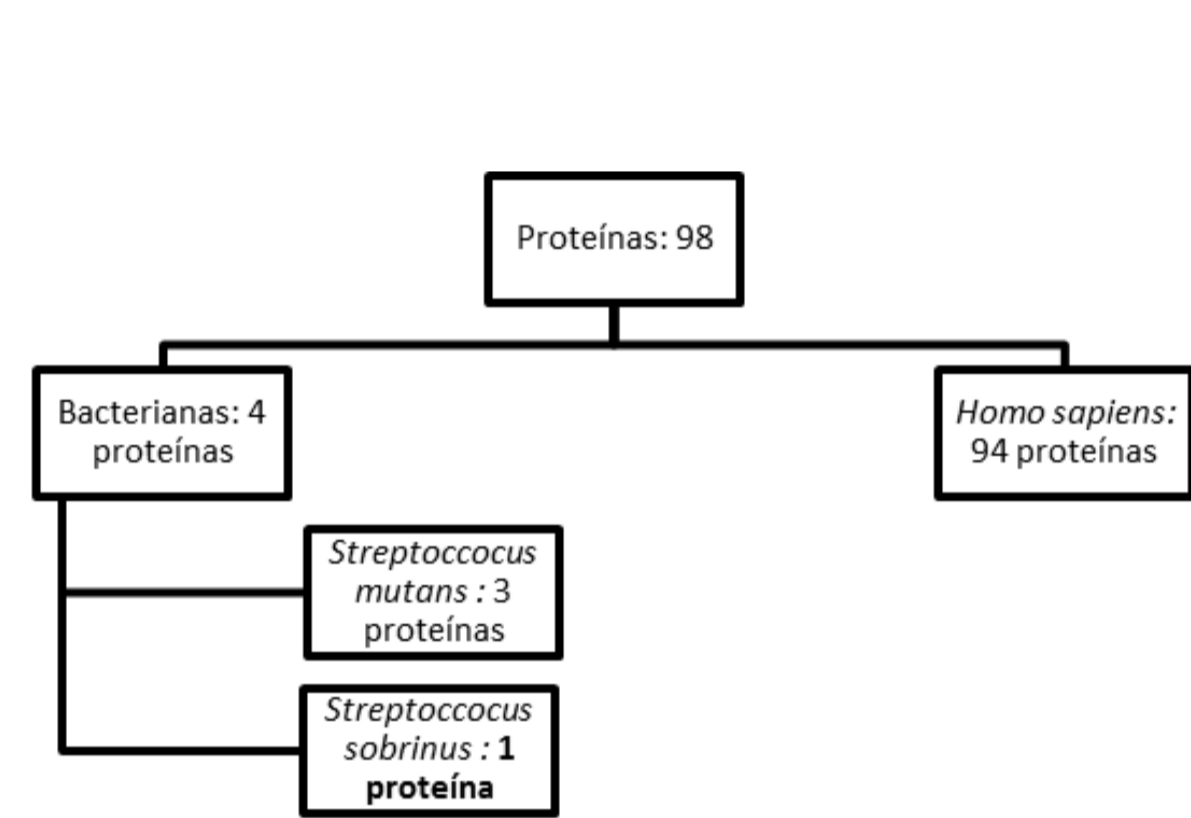


Fig. 2 Distribuição das proteínas identificadas de acordo com o organismo a que pertencem.

Das 98 proteínas analisadas ao longo deste trabalho, 94 são de origem humana e apenas 4 apresentam origem bacteriana, sendo três produzidas por *Streptococcus mutans* e uma por *Streptococcus sobrinus*.

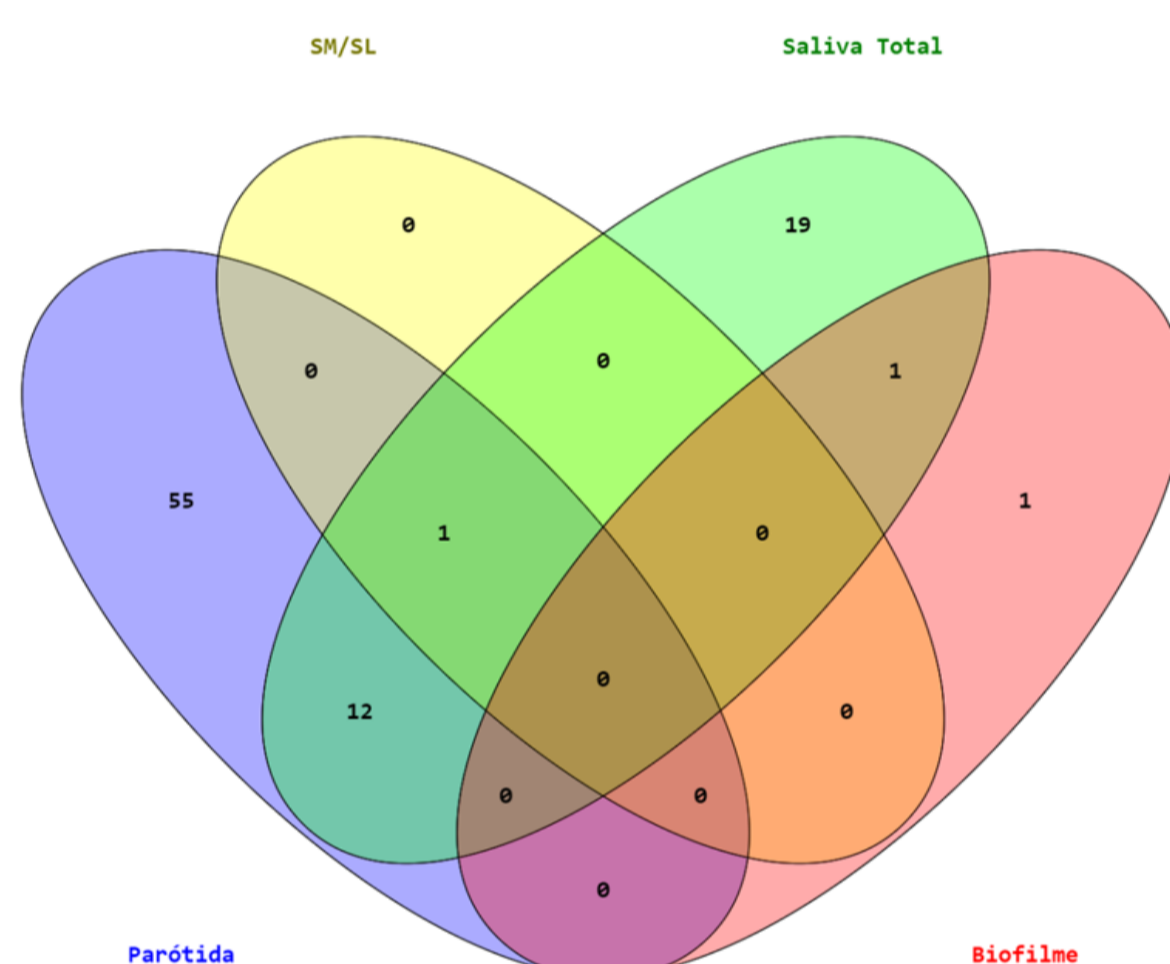


Fig. 3 Diagrama de Venn² representativo da distribuição das proteínas salivares identificadas segundo a sua origem.

Do total das proteínas orais identificadas em cárie dentária, 49 são provenientes de amostras de saliva total, 69 das glândulas parótidas, 2 do biofilme oral e 1 de glândulas SM/SL.

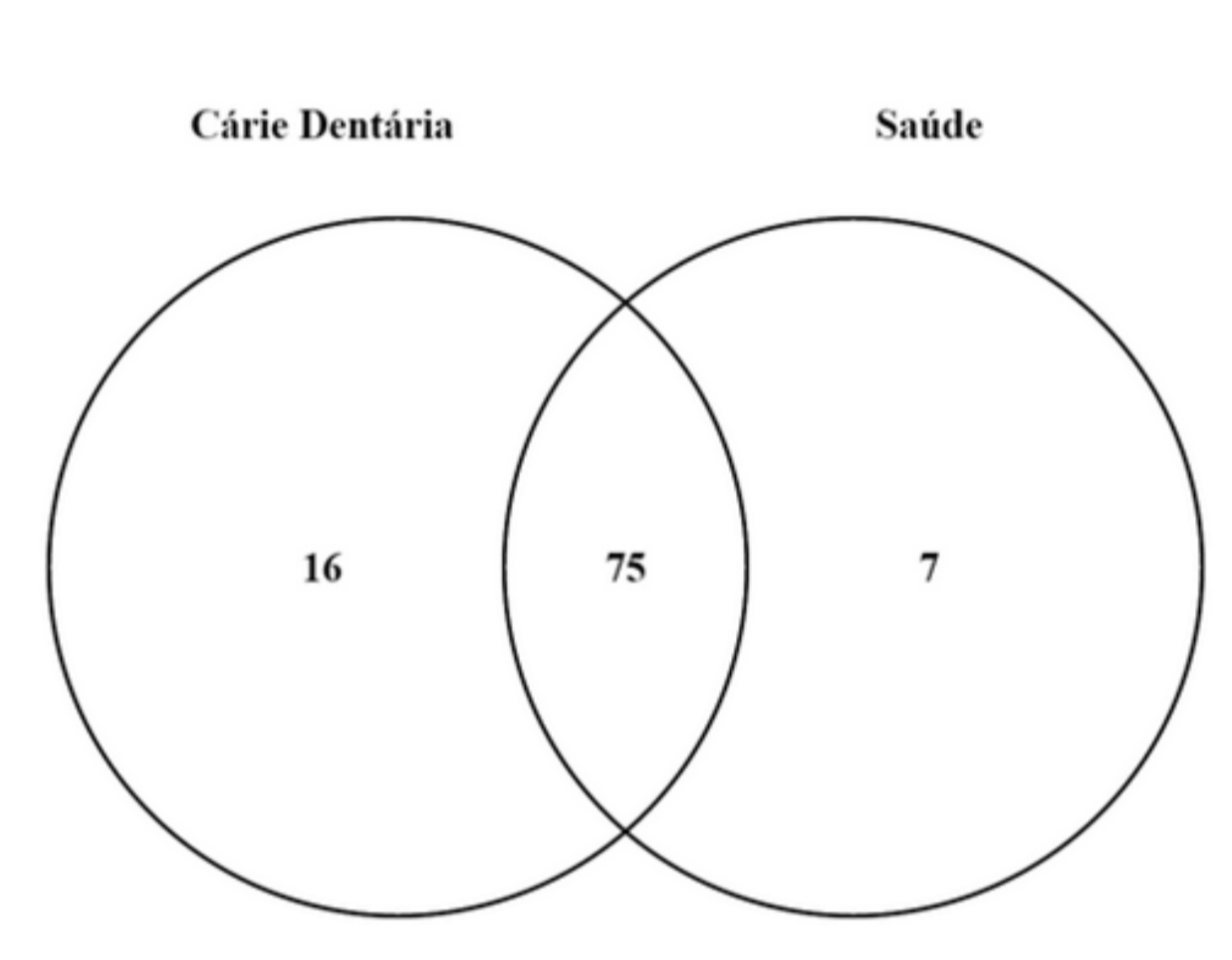


Fig. 4 Distribuição das proteínas identificadas em estudos relacionados com cárie dentária e a sua relação com estados de saúde e/ou cárie dentária.

Das 98 proteínas identificadas em estudos relacionados com cárie dentária, 75 foram identificadas tanto em indivíduos com cárie dentária como nos controlos saudáveis, 16 foram apenas identificadas na presença de cárie e 7 exclusivas do estado de saúde dentária.

Caracterização funcional do OralOma de cárie dentária

(recorrendo à ferramenta PANTHER³)

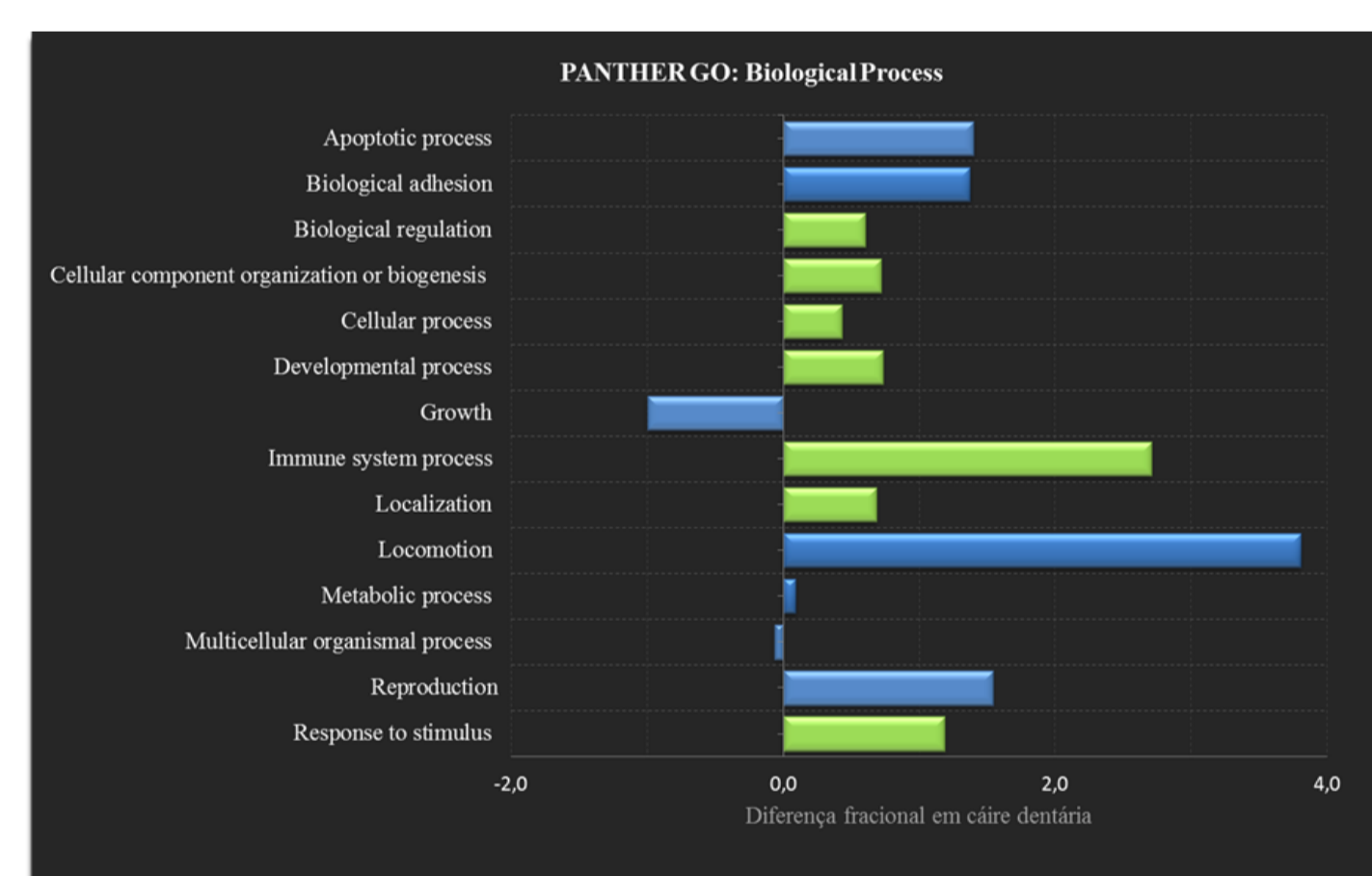


Fig. 5 Distribuição das proteínas salivares de pacientes com cárie dentária, segundo os processos biológicos em que intervêm.

É apresentada a diferença fraccional entre as proteínas identificadas em cárie dentária e no OralOma normal. A verde estão indicados os processos biológicos que apresentam uma alteração em relação ao OralOma Normal considerada estatisticamente significativa (p<0,05).

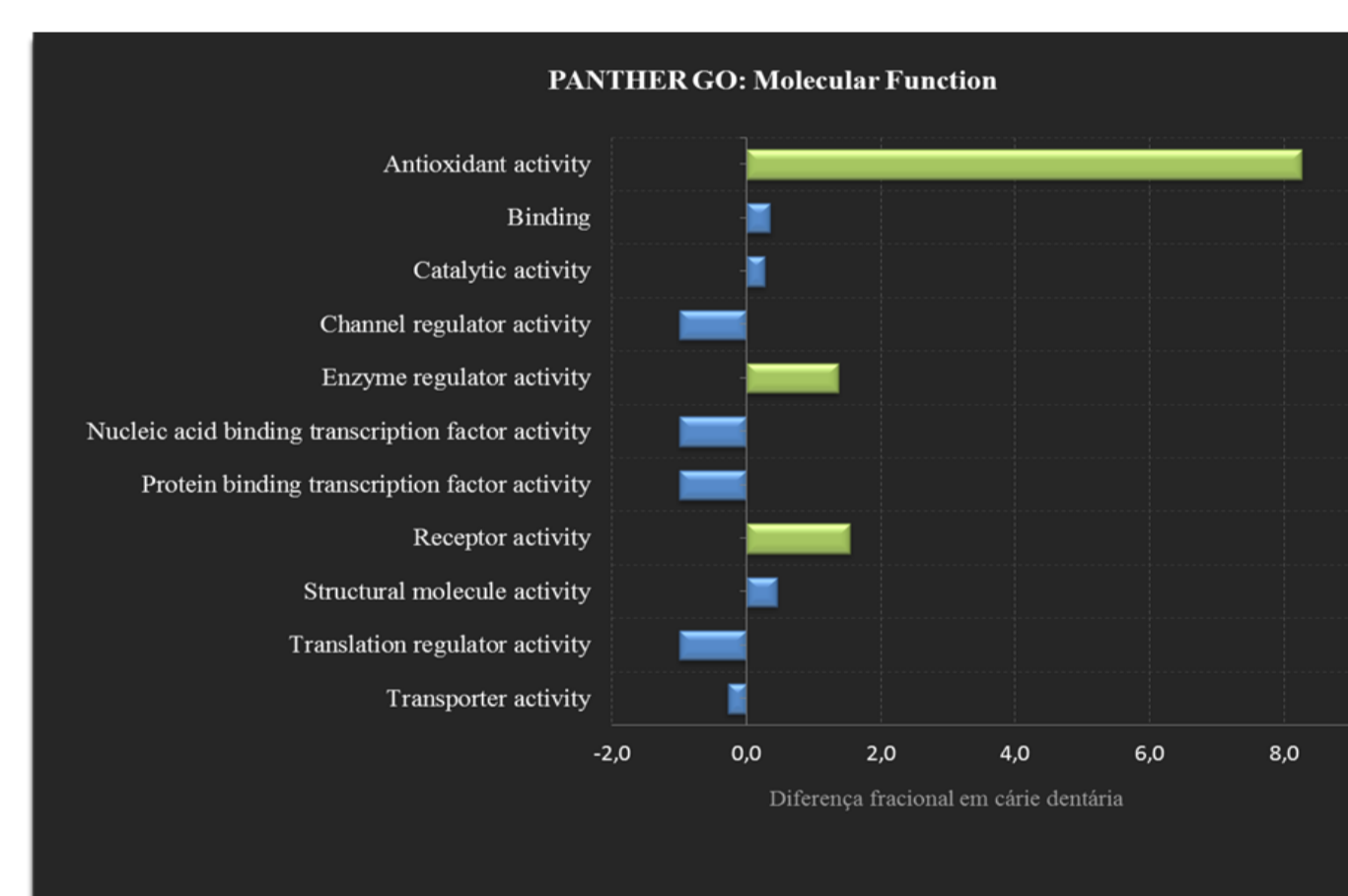


Fig. 6 Distribuição das proteínas salivares de pacientes com cárie dentária, segundo as funções moleculares que desempenham.

É apresentada a diferença fraccional entre as proteínas identificadas em cárie dentária e no OralOma normal. A verde estão indicadas as funções moleculares que apresentam uma alteração em relação ao OralOma Normal considerada estatisticamente significativa (p<0,05).

Análise de Interactoma de cárie dentária

(gerada através do algoritmo OralInt⁴ e visualizado com recurso à ferramenta Cytoscape⁵)

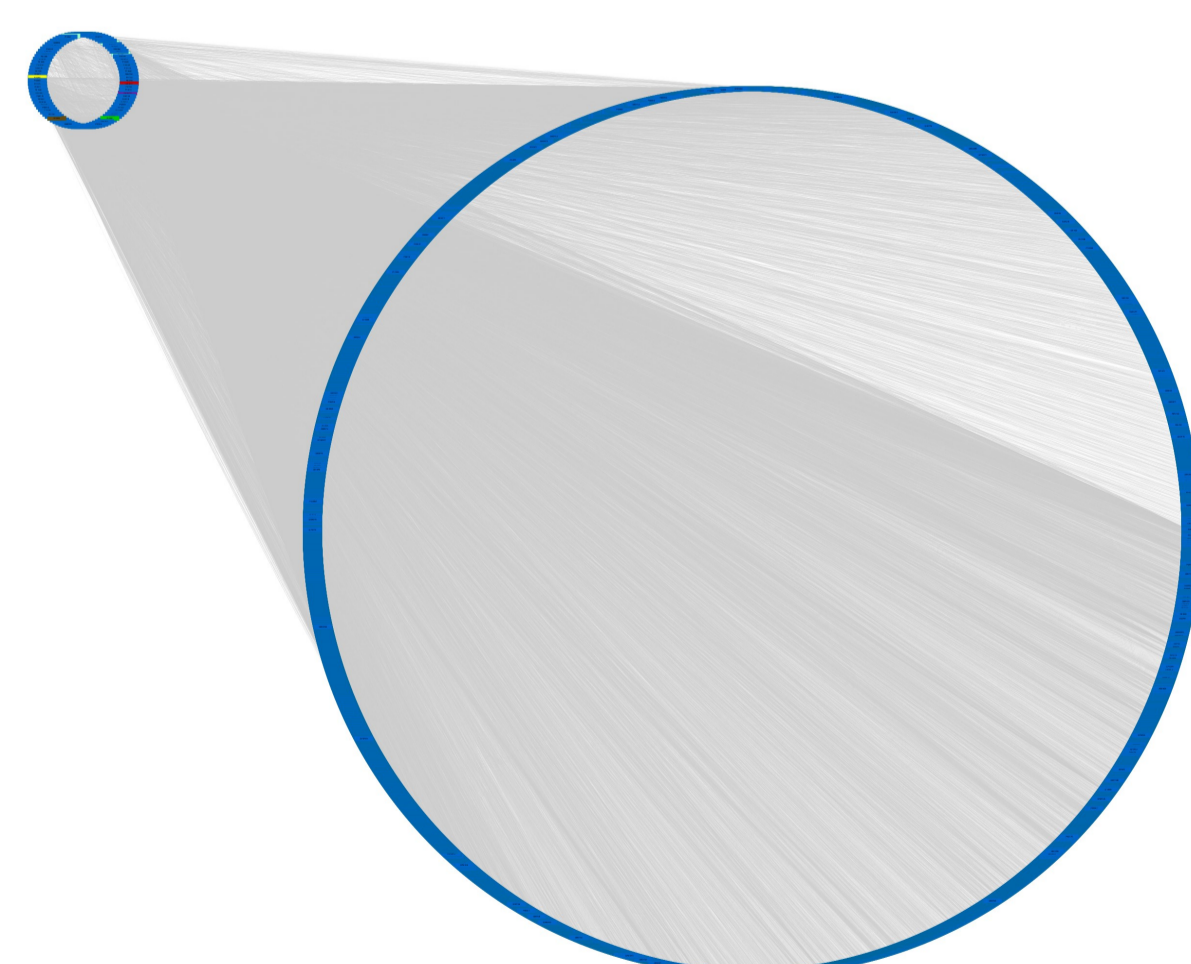


Fig. 7 Rede de interações (a cinzento) das proteínas orais de cárie dentária (círculo da esquerda) com as proteínas presentes no OralOma humano (círculo da direita).

No total foram contabilizadas 22.826 interações entre 8488 proteínas, das quais 2886 humanas e 5554 microbianas.

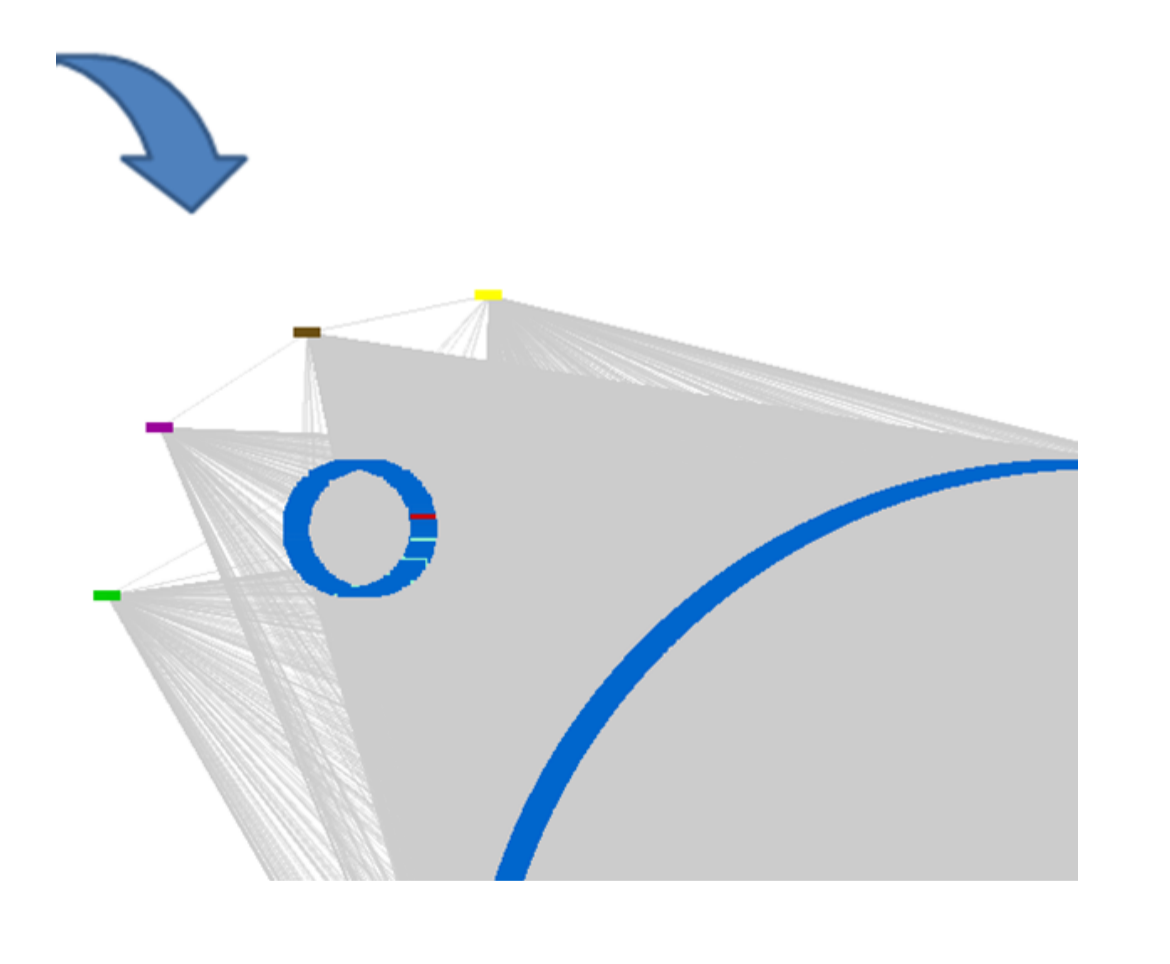


Fig. 8 Destaque das proteínas Transcobalamin-1 (verde), Peptidylprolyl cis-transisomeraseB (amarelo), Small proline-rich protein 3 (lilás) e histone 4 (castanho), a partir da rede de interações representada na figura 6.

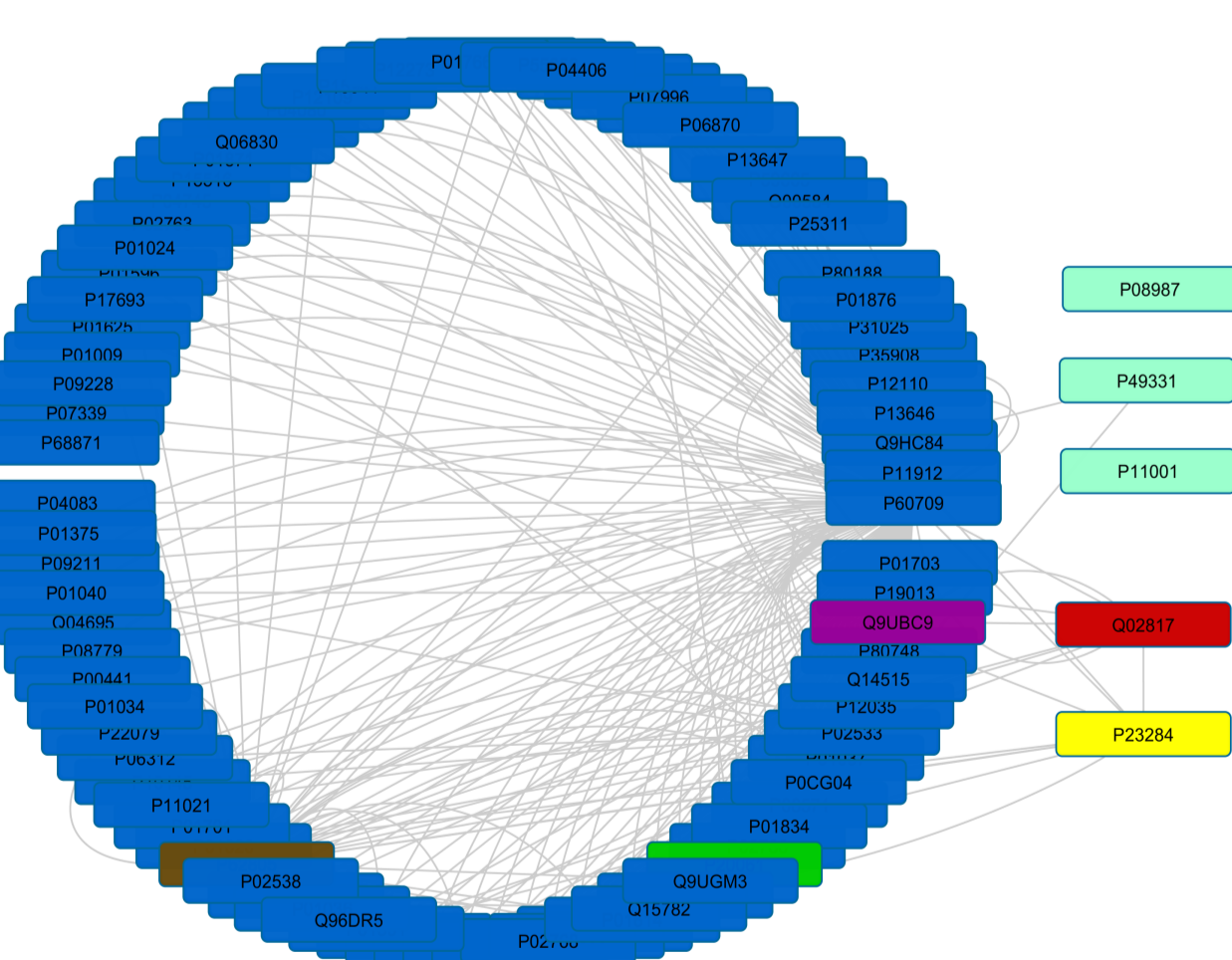


Fig. 9 Interações das proteínas orais de cárie dentária. Destaque das proteínas Transcobalamin-1 (verde), Peptidylprolyl cis-transisomeraseB (amarelo), Small proline-rich protein 3 (lilás), histone 4 (castanho) e mucine-2 (a vermelhor). A azul-claro estão destacadas as proteínas microbianas identificadas.

Discussão

No total foram incluídos 21 artigos, com datas de publicação até 9/06/2014, sendo que 5 apresentam datas de publicação anteriores a 2005 (1983-2003).

Das 98 proteínas analisadas ao longo deste trabalho, 94 são de origem humana e apenas 4 apresentam origem bacteriana, sendo três produzidas por *Streptococcus mutans* e uma por *Streptococcus sobrinus* (Figura 1), espécies bacterianas fortemente associadas ao desenvolvimento de cárie dentária.

A existência de uma predominância de proteínas identificadas exclusivamente em amostras salivares com origem na glândula parótida (Figura 2), prende-se com a análise de um estudo de proteómica não-dirigido realizado com amostras salivares desta glândula. No entanto, a facilidade de recolha de amostras de saliva total justifica a utilização predominante nos restantes estudos analisados.

Das 7 proteínas identificadas como exclusivas de indivíduos sem cárie (Fig.4) (*dermacidine*, *Ig heavy chain*, *Ig lambda chain*, *cytokeratin-3*, *transglutaminase 3*, *profilin-1* e *neutrophil defensin-1*) destacam-se funções antibacterianas e de remodelação estrutural da película aderida, com criação de películas mais resistentes aos ácidos.

Das proteínas identificadas ao longo deste estudo como exclusivas de cárie dentária verificou-se que das, 16 proteínas assinaladas, 7 (*mucin-5B*, *mucin-1*, *mucin-7*, *mucin-2*, *histatin-3*, *basic salivary proline-rich protein 1* e *alpha-1-antitrypsin*) surgem como “exclusivas” de cárie dentária como resultado de estudos em que não foi feita a comparação com amostras salivares de indivíduos livres de cárie.

Pela análise da Fig. 4 é possível verificar um número significativamente aumentado de proteínas envolvidas em processos biológicos como *immune system process* e a *response to stimulus* (p-value<0,01); também processos relacionados com *biological regulation*, *cellular component organization or biogenesis*, *cellular process*, *development process* e *localization* apresentaram-se aumentados com significância estatística (p-values <0,05). Estes resultados justificam-se pelo envolvimento de proteínas, não apenas na manutenção da homeostasia e resposta imunitária do hospedeiro mas também na formação e organização da placa bacteriana.

A análise das funções moleculares (Fig. 6) permite inferir um aumento significativo de proteínas orais envolvidas em processos de *antioxidant activity* (p-value <0,01), *enzyme regulator activity* e *receptor activity* (p-value <0,02) presentes em situação de cárie. Enquanto *enzyme regulator activity* e *receptor activity* se relacionam com os processos do sistema imunitário acima descritos, *antioxidant activity* associa-se à função do sistema da peroxidase salivar, com potencial de biomarcador de suscetibilidade pela elevada relação entre a presença de lesões cariosas e a produção de radicais livres.

Da análise do Interactoma de cárie dentária (Fig.7) salientámos as 4 proteínas do OralOma de cárie envolvidas no maior número de interações (Fig.8): a verde a proteína *Transcobalamin-1*, a amarelo *Peptidylprolyl cis-transisomeraseB*, a lilás *Small proline-rich protein 3* e a azul *histone 4*. O conhecimento da importância da função antibacteriana associada à interação PPIB-Mucin2, a nível do colon⁶, propôs-nos a pesquisa da possível existência da mesma relação na cavidade oral (Fig.9). Verificada a interação entre a proteína PPIB (amarelo) e MUC-2 (vermelho) e considerando que MUC-2 foi apenas identificada em indivíduos com cárie, sugerimos que, à semelhança do que acontece a nível intestinal, esta interação constitua um mecanismo de defesa antibacteriano na cavidade oral.

Conclusão

Diversos estudos realizados com o objetivo de relacionar composições proteicas salivares com diferentes estados de saúde dentária têm registado resultados inconsistentes, possivelmente resultantes da redundância funcional das proteínas salivares ou até mesmo da heterogeneidade das metodologias de estudo aplicadas. No entanto, deve enfatizar-se que a complexidade das proteínas presentes neste fluido define e é definido por uma série de intrincadas funções moleculares e processos biológicos que poderão estar relacionados com o desenvolvimento de lesões de cárie. A caracterização funcional do OralOma de cárie dentária permitiu inferir a presença de uma relação entre a cárie dentária e a presença de um elevado número de proteínas com ação antioxidante na saliva, nomeadamente associadas ao sistema da peroxidase salivar. A análise interatómica de cárie confirmou a existência de uma grande rede de interações existentes entre as proteínas do OralOma de cárie com as do OralOma Humano total, salientando-se *Peptidylprolyl cis-transisomeraseB*, *Small proline-rich protein 3* e *histone 4* pelo elevado número de interações com todas as proteínas orais. No que concerne a proteínas microbianas presentes no OralOma de cárie dentária, conclui-se que existem poucos estudos experimentais com as características necessárias para a sua identificação. Desta forma, confirmamos a necessidade de mais evidências que corroborem a existência de uma relação entre o papel das proteínas salivares e a modificação da suscetibilidade de um indivíduo à cárie dentária.

Bibliografia: ¹Arrais J, Rosa N, Melo J, Coelho E, Amaral D, Correia M, et al. OralCard: a bioinformatic tool for the study of oral proteome. Arch Oral Biol. England; 2013 Jul;58(7):762-72; ²Oliveros, J.C. (2007-2015) Venny. An interactive tool for comparing lists with Venn's diagrams http://bioinformatics.psb.cnr.it/tools/venny/index.html; ³Mi H, Muruganujan A, Thomas PD. PANTHER in 2013: modeling the evolution of gene function, and other gene attributes, in the context of phylogenetic trees. Nucleic Acids Res. England; 2013 Jan;41(Database issue):D377-86 http://pantherdb.org; ⁴Coelho E, Arrais J, Matos S, Pereira C, Rosa N, Correia M, et al. Computational prediction of the human-microbial oral interactome. BMC Syst Biol [Internet]. 2014;8:24; ⁵Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga N, Wang J, Ramage D, et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. Genome Res. United States; 2003 Nov;13(11):2498-504; ⁶Johansson M, Thomsson K, Hansson G. Proteomic analyses of the two mucus layers of the colon barrier reveal that their main component, the Muc2 mucin, is strongly bound to the Fcgbp protein. J Proteome Res. United States; 2009 Jul;8(7):3549-57.