

Laís Garreto Alves de Almeida Chagas

Avaliação da atividade proteolítica salivar de paciente com
Síndrome de Sjögren

Brasília
2017

Laís Garreto Alves de Almeida Chagas

Avaliação da atividade proteolítica salivar de paciente com
Síndrome de Sjögren

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Departamento de Odontologia da Faculdade de
Ciências da Saúde da Universidade de Brasília,
como requisito parcial para a conclusão do curso
de Graduação em Odontologia.

Orientador: Profa. Dra. Ana Carolina Acevedo
Poppe

Co-orientador: Profa. Dra. Izabela Marques
Dourado Bastos

Brasília
2017

A Deus e à minha família.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo seu infinito amor e por me proporcionar viver esse sonho. Ele é sempre bom.

Ao meu marido Danilo Chagas, que me deu suporte em cada etapa deste curso, se alegrando com minhas conquistas e me incentivando a dar o melhor de mim. Ele me ensinou a levar a vida de uma forma mais leve e sempre conseguiu ter palavras de ânimo nas minhas crises e desesperos sobre a UnB. Não haveria melhor amigo, marido e companheiro para vida que não fosse você, meu amor!

À minha família, especialmente à minha mãe e ao meu pai, que se dedicaram a me proporcionar a melhor educação formal e de caráter. Isso não tem preço! À minha tia Marlene Campana, que sempre interveio em momentos de escolhas certas na minha vida. Ao meu irmão, pelo amor e apoio. À minha prima Késia Rozzett que semeou em mim o desejo de estudar na UnB e que me encorajou nas pesquisas de iniciação científica.

À professora Izabela Bastos, que primeiro acreditou no meu potencial em pesquisa, logo quando consegui a bolsa do programa de iniciação científica Jovens Talentos para a Ciência. Sem o seu incentivo, certamente esse trabalho não existiria. Obrigada por me estimular a correr atrás dos meus sonhos e me ensinar tanto. Te admiro muito!

À professora Ana Carolina Acevedo, que confiou no meu trabalho ao longo de três iniciações científicas, me proporcionando diversas oportunidades de crescimento e me desafiando sempre à excelência. Obrigada pela compreensão em minhas dificuldades. Quando pensei em desistir, você me mostrou que eu só precisava aprender a cobrar menos de mim mesma. Merci!

Às professoras Flávia Nader e Carla Nunes, que contribuíram com minha pesquisa. Ao professor Otávio Nóbrega, que me ajudou imensamente nas análises estatísticas. Aos amigos do LIPH, Jhonata, Clênia, Milene, Camila, Graziela, Allan, Débora, Yanna, Natália G., Natália A., Amanda, Caio, Thuanny e Samuel, que me ensinaram tantos protocolos, utilizações de equipamentos, análises estatísticas, e não mediram esforços para me ajudar.

À professora Lilian de Paula e à Flávia Modesto por cederem a este trabalho as amostras de saliva coletadas. À professora Hélène Chardin, que me instigou pesquisar o melhor método de coleta salivar. À Caroline e à Ana Luíza, por me auxiliarem na preparação para apresentação da JOUnB e SBPqO.

À querida amiga e parceira Lorena, que esteve comigo em cada novo desafio clínico, encorajando e apoiando. Aos amigos Rafael, André e Lucas, com os quais eu pude contar em tudo na odontologia e que os levarei para a vida. A todos os professores da graduação em odontologia da UnB, que contribuíram para a minha formação profissional.

Aos amigos da FBCC, especialmente Eronaldo, Lenísia e Débora, que me sustentaram em orações e ânimo ao longo da jornada de UnB.

EPÍGRAFE

“E tudo quanto fizerdes, fazei-o de todo coração, como ao
SENHOR, e não aos homens.”

Colossenses 3:23

RESUMO

GARRETO, Laís. Avaliação da atividade proteolítica salivar de paciente com Síndrome de Sjögren. 2017. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Odontologia) – Departamento de Odontologia da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

A Síndrome de Sjögren (SS) é uma doença sistêmica autoimune, com inflamação crônica de glândulas exócrinas, principalmente as salivares e lacrimais. Diversos trabalhos têm relatado a saliva como um meio potencial de diagnóstico de várias doenças, pois a identificação de biomarcadores salivares permitiria o diagnóstico de patologias. O objetivo desse estudo foi avaliar a atividade enzimática de proteases na saliva de pacientes com diagnóstico de Síndrome de Sjögren (SS) e de pacientes saudáveis, com intuito de identificar possíveis marcadores biológicos para SS. Para esse propósito, foram analisadas amostras de saliva total de 40 indivíduos, em estudo de caso controle. A saliva total estimulada foi coletada em jejum e, após centrifugada a 10.000 rpm, por 10 minutos, foi armazenada a -80°C. As proteínas totais foram quantificadas. Para a caracterização da atividade proteolítica, as amostras foram testadas com substratos sintéticos e inibidores de proteases, em espectrofotômetro, e testadas por zimografia na presença de inibidores. A proteólise do substrato Gly-Pro-AMC e sua inibição pelo AEBSF indica que essa enzima pertence à família de serino-proteases, possivelmente uma DPP-4. Em zimografia, as bandas de atividade inibidas pelo EDTA indicam que a atividade proteolítica pertence à família de metaloproteases (MMP), possivelmente MMP-2 e MMP-9. Os resultados obtidos sugerem que a atividade proteolítica salivar difere entre os grupos avaliados. Estudos mais aprofundados serão necessários, a fim de melhor compreender o papel das proteases estudadas na patogênese da SS.

ABSTRACT

GARRETO, Laís. Evaluation of salivary proteolytic activity of patient with Sjögren's Syndrome. 2017. Undergraduate Course Final Monograph (Undergraduate Course in Dentistry) – Department of Dentistry, School of Health Sciences, University of Brasília.

Sjögren's Syndrome is an autoimmune disease with chronic inflammation of the exocrine glands, mainly the salivary and lacrimal. Several authors have suggested saliva as a potential tool for diagnosing pathological conditions by the identification of salivary biomarkers. The aim of the present study was to evaluate the enzymatic activity of protease in the saliva of patients diagnosed with Sjögren Syndrome (SS) and healthy patients, in order to identify potential biological markers for SS. For this purpose, whole saliva samples from 40 individuals were analyzed. The stimulated whole saliva was collected under fasting conditions and centrifuged to 10.000 rpm for 10 minutes. All samples were stored at -80°C. The total proteins were quantified. To characterize the proteolytic activity, the samples were tested with synthetic substrates and protease inhibitors, in spectrophotometer, and tested by zymography in the presence of inhibitors. The proteolysis of the substrate Gly-Pro-AMC and its inhibition by AEBSF suggested that the enzyme belongs to the serine-protease's family, probably DPP-4. In zymography assays, the activity bands inhibited by EDTA indicated that the proteolytic activity belongs to the metalloprotease's (MMP) family, probably MMP-2 and MMP-9. The results obtained suggest that the salivary proteolytic activity differs between the assessed groups. Further studies are necessary, in order to better understand the role of the studied proteases in pathogenesis of the SS.

SUMÁRIO

Artigo Científico	17
Folha de Título	19
Resumo	20
Abstract	22
Introdução	25
Objetivo	28
Materiais e Métodos	28
Resultados	32
Discussão	41
Conclusão	45
Referências	47
Anexos	52
Anexo I - Normas da Revista	52
Anexo II - Aprovação do Comitê de Ética	57
Anexo III - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	58
Anexo IV - Premiação	59

ARTIGO CIENTÍFICO

Este trabalho de Conclusão de Curso é baseado no artigo científico:

GARRETO, Laís; BASTOS, Izabela MD; ACEVEDO, Ana Carolina. Evaluation of salivary proteolytic activity of patient with Sjögren's Syndrome.

Apresentado sob as normas de publicação do Journal of Dental Research

FOLHA DE TÍTULO

Avaliação da atividade proteolítica salivar de paciente com Síndrome de Sjögren

Evaluation of salivary proteolytic activity of patient with Sjögren's Syndrome

Laís Garreto Alves de Almeida Chagas¹

Ana Carolina Acevedo Poppe²

Izabela Marques Dourado Bastos³

¹ Aluna de Graduação em Odontologia da Universidade de Brasília.

² Professora Adjunta de Biopatologia da Universidade de Brasília.

³ Professora Adjunta de Microbiologia da Universidade de Brasília.

Correspondência: Profa. Dra. Ana Carolina Acevedo Poppe
Campus Universitário Darcy Ribeiro - UnB - Faculdade de
Ciências da Saúde - Departamento de Odontologia - 70910-900 -
Asa Norte - Brasília - DF
E-mail: acevpoppe@gmail.com / Telefone: (61) 3107-1977

RESUMO

Avaliação da atividade proteolítica salivar de paciente com Síndrome de Sjögren

Resumo

A Síndrome de Sjögren (SS) é uma doença sistêmica autoimune, com inflamação crônica de glândulas exócrinas, principalmente as salivares e lacrimais. Diversos trabalhos têm relatado a saliva como um meio potencial de diagnóstico de várias doenças, pois a identificação de biomarcadores salivares permitiria o diagnóstico de patologias. O objetivo desse estudo foi avaliar a atividade enzimática de proteases na saliva de pacientes com diagnóstico de Síndrome de Sjögren (SS) e de pacientes saudáveis, com intuito de identificar possíveis marcadores biológicos para SS. Para esse propósito, foram analisadas amostras de saliva total de 40 indivíduos, em estudo de caso controle. A saliva total estimulada foi coletada em jejum e, após centrifugada a 10.000 rpm, por 10 minutos, foi armazenada a -80°C. As proteínas totais foram quantificadas. Para a caracterização da atividade proteolítica, as amostras foram testadas com substratos sintéticos e inibidores de proteases, em espectrofotômetro, e testadas por zimografia na presença de inibidores. A proteólise do substrato Gly-Pro-AMC e sua inibição pelo AEBSF indica que essa enzima pertence à família de serino-proteases, possivelmente uma DPP-4. Em zimografia, as bandas de atividade inibidas pelo EDTA indicam que a atividade proteolítica pertence à família de metaloproteases (MMP), possivelmente MMP-2 e MMP-9. Os resultados obtidos sugerem que a atividade proteolítica salivar difere entre os grupos avaliados. Estudos mais aprofundados serão necessários, a fim de melhor compreender o papel das proteases estudadas na patogênese da SS.

Palavras-chave

Saliva, Síndrome de Sjögren, Protease, Atividade Enzimática

ABSTRACT

Evaluation of salivary proteolytic activity of patient with Sjögren's Syndrome

Abstract

Sjögren's Syndrome is an autoimmune disease with chronic inflammation of the exocrine glands, mainly the salivary and lacrimal. Several authors have suggested saliva as a potential tool for diagnosing pathological conditions by the identification of salivary biomarkers. The aim of the present study was to evaluate the enzymatic activity of protease in the saliva of patients diagnosed with Sjögren Syndrome (SS) and healthy patients, in order to identify potential biological markers for SS. For this purpose, whole saliva samples from 40 individuals were analyzed. The stimulated whole saliva was collected under fasting conditions and centrifuged to 10.000 rpm for 10 minutes. All samples were stored at -80°C. The total proteins were quantified. To characterize the proteolytic activity, the samples were tested with synthetic substrates and protease inhibitors, in spectrophotometer, and tested by zymography in the presence of inhibitors. The proteolysis of the substrate Gly-Pro-AMC and its inhibition by AEBSF suggested that the enzyme belongs to the serine-protease's family, probably DPP-4. In zymography assays, the activity bands inhibited by EDTA indicated that the proteolytic activity belongs to the metalloprotease's (MMP) family, probably MMP-2 and MMP-9. The results obtained suggest that the salivary proteolytic activity differs between the assessed groups. Further studies are necessary, in order to better understand the role of the studied proteases in pathogenesis of the SS.

Keywords

Saliva, Sjögren's Syndrome, Protease, Enzymatic activity

INTRODUÇÃO

A Síndrome de Sjögren (SS) é uma doença sistêmica autoimune, com inflamação crônica de glândulas exócrinas, principalmente as salivares e lacrimais (Brito-Zéron *et al.* 2016). O principal sintoma é o ressecamento das mucosas oral e ocular, devido à diminuição de secreções glandulares exócrinas. As manifestações bucais são hipossalivação, xerostomia, ardência bucal, aumento do risco de lesões de cárie cervical e erosão dental, candidíase oral, queilite angular, língua fissurada e redução de papilas gustativas. Além disso, a SS pode se manifestar nos sistemas nervoso periférico, cardiovascular, respiratório, digestório, excretor e tegumentar (Brito-Zéron *et al.* 2016; Bolstad *et al.* 2016).

Acredita-se que a etiologia da doença envolve fatores ambientais, tendo como gatilho as infecções virais, e fatores de susceptibilidade genética, relativamente pouco explorados. Consideradas um possível gatilho para patogênese da SS, estas infecções virais podem ocorrer, por exemplo, por meio de vírus Herpes Humano 6, Epstein-Barr e Citomegalovírus (Bolstad *et al.*, 2016). Com ocorrência de aproximadamente 0,5% da população geral (Barone *et al.*, 2016), a SS é, dentre as desordens autoimunes, uma das mais prevalentes. As mulheres são predominantemente mais acometidas pela SS, representando 90% dos pacientes, na faixa etária entre a quarta e a sexta década de vida (González *et al.* 2013).

Os pacientes que possuem apenas a desordem autoimune da SS são acometidos pela SS primária (SSp). Se concomitantemente a SS houver outras condições autoimunes, como artrite reumatoide e lúpus eritematoso sistêmico, classifica-se como SS secundária. Aproximadamente 5% dos pacientes com SSp desenvolvem linfoma, com alto risco de mortalidade (Bolstad *et al.* 2016; Barone *et al.* 2016). O diagnóstico de pacientes com SS se dá pela confirmação de testes histopatológicos de

glândulas salivares menores. Ademais, a ultrassonografia de glândula salivar tem sido um instrumento promissor para detecção de anormalidades em SSp, bem como a identificação de biomarcadores proteômicos em saliva total (Bolstad *et al.* 2016; Fox 2016).

A saliva total é composta pela secreção de glândulas salivares maiores e menores, pelo fluido crevicular, por células descamadas da mucosa, por bactérias e seus metabólitos, sendo capaz de manter a saúde e a homeostase do ecossistema bucal (Katsiougianis *et al.* 2016; Zhang *et al.* 2016). Devido sua composição orgânica, representada por proteínas, enzimas, aminoácidos, imunoglobulinas e hormônios, e inorgânica, por íons, a saliva reflete perfis metabólicos do indivíduo. Sendo assim, a saliva tem sido usada como um meio diagnóstico e como monitoramento de tratamento de doenças bucais e sistêmicas, autoimunes e de imunodeficiência, como doença periodontal, câncer, SS e HIV (Katsiougianis *et al.* 2016; Khurshid *et al.* 2016; Mal, 2016; Guerra *et al.* 2015; Porto-Mascarenhas *et al.* 2017).

O diagnóstico salivar é um método não-invasivo, seguro, de fácil coleta e baixo custo. Além disso, a amostra não sofre coagulação, como ocorre com o sangue (Khurshid *et al.* 2016). Por ser um método não-invasivo, reduz a ansiedade e o desconforto do paciente, permitindo um monitoramento longitudinal mais efetivo (Katsiougianis *et al.* 2016; Zhang *et al.* 2016).

As proteínas expressas na saliva podem ser potenciais biomarcadores, capazes de identificar condições de normalidade ou patogenicidade (Katsiougianis *et al.* 2016). Uma forma de identificar prováveis marcadores biológicos moleculares é pela avaliação da atividade proteolítica salivar. As proteases ou enzimas proteolíticas hidrolisam ligações peptídicas, e podem ser exopeptidases, que são capazes de clivar aminoácidos nas posições terminais de uma proteína, ou endopeptidases, que

hidrolisam ligações peptídicas internas de uma proteína. A maioria das proteases são altamente específicas e podem processar uma quantia restrita de substratos, com sequência definida de aminoácidos (Barrett e McDonald 1986). Sendo assim, para que essas enzimas sejam adequadamente caracterizadas, é necessário que sejam testados não somente substratos, mas inibidores enzimáticos (Bastos *et al.* 2013).

Metaloproteases de matriz extracelular (MMP) são endopeptidases dependentes de cátions divalentes, como cálcio, zinco e magnésio, geralmente envolvidas em processos fisiológicos tissulares de desenvolvimento e reparo. No entanto, o aumento delas está envolvido em processos inflamatórios e patológicos (Rathnayake *et al.* 2017). Podem ser classificadas por sua estrutura e pelo substrato específico que hidrolisam, sendo: collagenases, gelatinases, estromelinas, matrilisinas, entre outras (Maciejczyk *et al.* 2016).

A dipeptidil peptidase 4 (DPP-4) é uma exopeptidase da família prolil oligopeptidase, pertencente à classe de serino-proteases, que cliva aminoácidos prolina ou alanina na extremidade N-terminal de uma cadeia peptídica, a qual tem sido potencial no tratamento de distúrbios neurológicos, hormonais e metabólicos, como Alzheimer, depressão, pressão sanguínea anormal e diabetes tipo II (Bastos *et al.*, 2013; Harstad *et al.* 2013; Libério *et al.* 2014).

Têm sido relatados na literatura estudos que relacionam a atividade das proteases em doenças autoimunes por meio da análise sérica, como lúpus eritematoso sistêmico e esclerose sistêmica (Liu *et al.* 2005; Carlsson *et al.* 2011). No entanto, escassos trabalhos têm avaliado a atividade de proteases na saliva, à exceção dos estudos que avaliam as metaloproteases (Maciejczyk *et al.* 2016). No presente momento, não foram encontrados estudos relacionados à atividade proteolítica na saliva de indivíduos em patologias sistêmicas que comprometam o fluxo salivar, como a SS.

OBJETIVO

Com o intuito de identificar possíveis marcadores biológicos para SS, o objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade enzimática de proteases na saliva de indivíduos com diagnóstico de Síndrome de Sjögren (SS) e de indivíduos não acometidos por SS.

MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo foi desenvolvido no âmbito da tese de doutorado no Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, na Universidade de Brasília, pela aluna Flávia Marques Borba Modesto.

A avaliação dos participantes do estudo para amostra populacional e a coleta da saliva foram realizadas dentro deste projeto, aprovado no comitê de ética CEP/FS, 073/11 (Anexo 2). Todos os indivíduos participantes do estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 3).

AMOSTRA POPULACIONAL:

Trata-se de um estudo de caso controle, no qual houve uma comparação da atividade proteolítica salivar entre indivíduos na faixa etária de 25 a 82 anos. Foram avaliadas amostras de saliva estimulada de 40 indivíduos, sendo 20 diagnosticados com SS pelo Serviço de Reumatologia do Hospital Universitário de Brasília (HUB) conforme critério de diagnóstico Americano-Europeu para classificação de SS (Vitali *et al.* 2002) e 20 não acometidos por SS. De cada grupo, 19 são mulheres e 1 é homem. No grupo de indivíduos com SS, há 10 com SS primária e 10 com SS secundária. Foram excluídos os indivíduos com doenças

sistêmicas ou com fatores que pudessem interferir nos resultados deste estudo, tais como: portadores de HIV, HCV, HVB ou HTLV-1; diabéticos; tabagistas, pacientes com linfoma, previamente diagnosticados, pacientes com sarcoidose, história de tratamento radioterápico de cabeça e pescoço e uso de medicação anticolinérgica.

COLETA DA SALIVA:

A saliva total estimulada é o fluido salivar total coletado por meio do estímulo mastigatório de goma de mascar sem sabor às glândulas salivares. A saliva total estimulada foi coletada em jejum, entre 7 e 10 horas da manhã, com intuito de atenuar a influência do ritmo circadiano. Os indivíduos foram instruídos a realizar a higiene bucal uma hora antes do exame. Após a coleta, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm, por 10 minutos e armazenadas a -80°C no Laboratório de Histopatologia Bucal, FS-UnB.

TESTES DE ANÁLISE ENZIMÁTICA NA SALIVA:

Os testes de análise enzimática foram realizados no Laboratório de Interação Patógeno-Hospedeiro (LIPH), IB-UnB, sob orientação da Prof. Dra. Izabela Marques Dourado Bastos.

As proteínas totais da saliva foram quantificadas por meio de fluorometria no equipamento Qubit. Para ajuste da quantificação salivar, as amostras foram carregadas em SDS PAGE a 10% e coradas em prata, a fim de visualizar o perfil eletroforético de concentrações mais baixas de proteína, já que a técnica confere maior sensibilidade quando comparada à técnica de coloração por Coomassie Blue. As amostras foram fervidas por 5 minutos e tratadas com tampão de amostra, os quais contém DTT e β -mercapto.

Foram avaliadas as amostras de saliva estimulada dos indivíduos não acometidos e acometidos por SS em atividade proteolítica da saliva contra peptídeos fluorogênicos. A atividade enzimática da DPP IV presente foi medida por meio da liberação do **7-amino-4-metilcoumarin** (AMC) pela hidrólise do substrato Gly-Pro-AMC (glicina-prolina-4-aminometilcumarina) durante 20 minutos (Santana *et al.* 1997). O AMC liberado foi medido no espectrofluorímetro SpectraMax M5 ROM v3.0.22, a excitação de 380nm e emissão de 460nm em microplaca de 96 poços, em FU/min. Todas as reações enzimáticas foram realizadas em tampão de atividade (HEPES 25mM, pH 7,5) na presença de 10 μ M de substrato em 100 μ L de volume final. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. Para inibição proteolítica específica do GP, foram testados os inibidores AEBSF, E-64, EDTA, Leupeptina, Pepstatina A, TLCK e TPCK, realizados em duplicata, como observado na Tabela 1.

<i>Inibidores</i>	<i>Concentração final</i>	<i>Proteases inibidas</i>
<i>AEBSF</i>	1mM	Serino-proteases
<i>E-64</i>	100 μ M	Cisteíno proteases
<i>EDTA</i>	2mM	Metaloproteases
<i>Leupeptina</i>	100 μ M	Serino-proteases
		Cisteíno proteases
		Threonino-proteases
<i>Pepstatina A</i>	100 μ M	Ácido aspártico
<i>TLCK</i>	100 μ M	Serino-proteases
		Cisteíno proteases
<i>TPCK</i>	100 μ M	Serino-proteases
		Cisteíno proteases

Tabela 1 – Inibidores de proteases, suas concentrações finais em ensaios fluorimétricos e em zimografia, e as classes de proteases inibidas.

A zimografia, técnica de eletroforese na qual observa-se atividade proteolítica em gel de gelatina, foi carregada com amostras de saliva estimulada com 500ng de proteínas em SDS PAGE 8%, copolimerizado com gelatina 0,1% (w/v). As amostras foram tratadas com tampão de amostra sem DTT e sem β -mercapto, para aplicação nos poços do gel. Para que se pudessem ser visualizadas as bandas de atividade, os géis foram submetidos a duas lavagens com Tris-HCl 100mM pH7,5 e Triton 2,5% (v/v), sendo cada uma por 30 minutos, e incubadas a 37°C overnight. Em seguida, os géis foram corados com solução fixadora de Coomassie Blue R-250, durante 1 hora, em temperatura ambiente e descorados com solução descorante. Dentre os testes realizados em zimografia, procedeu-se com a comparação da atividade enzimática de saliva estimulada de indivíduos controle e daqueles acometidos pela SS. Para inibição proteolítica específica das enzimas que hidrolisam a gelatina, testam-se os inibidores clássicos AEBSF, E-64, EDTA. Como o EDTA é um inibidor reversível, a coluna de gel com a amostra foi tratada em lavagem e incubação em concentração final de EDTA 2mM.

ANÁLISE DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA:

A análise estatística da concentração proteica salivar dos grupos foi realizada pelo teste T de Student e pelo teste de Levene, como estatística inferencial, com $p < 0,05$. A análise estatística da atividade enzimática específica de GP entre o grupo controle e o acometido por SS, bem como a análise estatística das bandas de atividade enzimática, baseada na presença de determinado peso molecular em cada indivíduo, e em sua intensidade, foram realizadas por meio do Teste Mann-Whitney, com $p < 0,05$. A intensidade das bandas de atividade enzimática e a atividade enzimática específica de GP foram comparadas quanto ao estágio clínico de SS pelo teste de correlação de Spearman, com $p < 0,05$.

A intensidade das bandas de atividade em zimografia foi avaliada por densitometria, utilizando o software de imagem ImageJ.

RESULTADOS

A quantificação proteica (ng/ μ L) em cada amostra de saliva foi realizada em ambos os grupos. O teste T de Student e o teste de Levene revelaram diferenças nos valores médios de concentração de proteína total entre os grupos ($p < 0,05$). Os indivíduos acometidos pela SS apresentaram menor concentração proteica, com maior amplitude de valores, quando comparados a indivíduos não acometidos, como ilustrado na Figura 1.

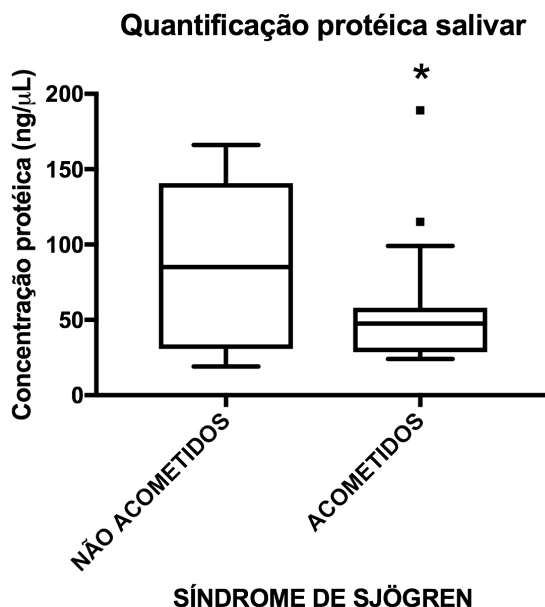


Figura 1 – Quantificação proteica salivar. Distribuição dos valores de concentração protéica (ng/ μ L) de indivíduos não acometidos e acometidos por SS. O teste T de Student e o teste de Levene ($p < 0,05$) apontam que há diferentes valores médios de concentração de proteína entre os grupos.

Houve atividade proteolítica salivar contra peptídeo fluorogênico Gly-Pro-AMC e foi significativamente ($p<0,05$) mais expressiva em saliva de indivíduos acometidos pela SS que em não acometidos por SS, de acordo com a Figura 2 e Tabela 2.

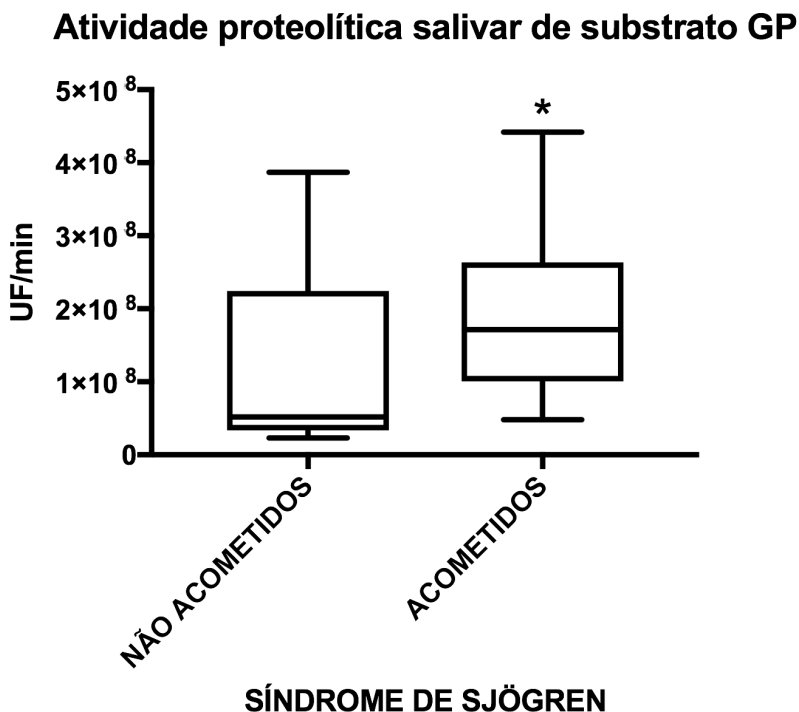


Figura 2 – Atividade proteolítica salivar com substrato Gly-Pro-AMC. O grupo acometido por SS apresentou maior liberação de UF/min em sua atividade proteolítica específica que o grupo não acometido por SS, com $p<0,05$.

Com intuito de identificar a classe de protease a qual se relaciona a hidrólise do substrato Gly-Pro-AMC, em teste com saliva total estimulada de indivíduo normal, observou-se a inibição proteolítica específica pelo inibidor de serino-protease AEBSF

(4-(2-aminoethyl) benzenesulfonyl fluoride hydrochloride), como observado na Figura 3 e Tabela 2.

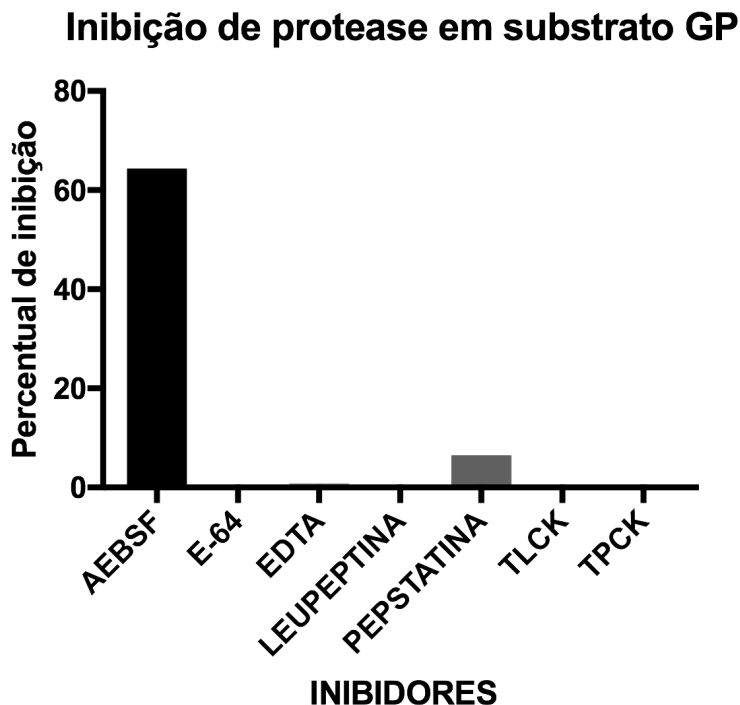


Figura 3 – Inibição de protease em substrato Gly-Pro-AMC. Teste com saliva total estimulada de indivíduo normal, com inibidores de protease, no qual se observa a inibição específica por AEBSF.

O ajuste da quantificação proteica salivar foi satisfatoriamente observado em perfil eletroforético, com distribuição da concentração proteica equivalente entre as amostras e identificação dos pesos moleculares de bandas protéicas. A zimografia, espelhada ao gel do perfil eletroforético, indicou atividade gelatinolítica tanto nas amostras salivares de indivíduos não acometidos quanto naqueles acometidos por SS, de acordo com a Figura 4.

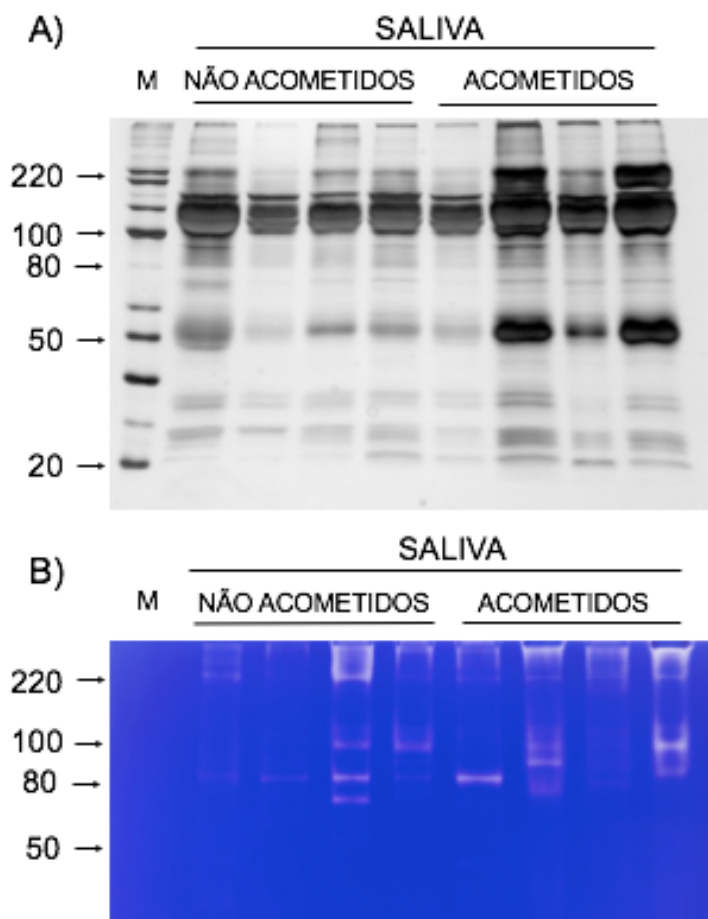


Figura 4 – Perfil proteico e de atividade na saliva (A) SDS PAGE 10% para normalização das amostras salivares, tendo como referência a quantificação proteica pelo Qubit, ilustrando pesos moleculares de bandas de proteína e concentração proteica satisfatoriamente pareada. (B) Zimografia SDS PAGE 8% copolimerizado com gelatina 0,1% (w/v), para análise da atividade proteolítica salivar em gel de gelatina, sendo M o marcador de proteínas. Géis corridos em SDS PAGE simultaneamente, com as mesmas amostras de indivíduos não acometidos e acometidos por SS, no qual se observa diferentes pesos moleculares de proteases e diferentes intensidades de atividade proteolítica.

Com o objetivo de identificar os pesos moleculares e as diversas intensidades das bandas de atividade proteolítica da saliva de indivíduos SS em relação aos indivíduos controle em gel de gelatina, realizou-se mapeamento de todas as bandas presentes e densitometria. Foram identificadas 10 bandas, nomeadas com seu peso molecular (kDa), como observado na Tabela 2.

Verificou-se diferença significativa ($p < 0,05$) na intensidade da atividade gelatinolítica da banda >220 kDa e 50kDa, pelo Teste Mann-Whitney, como observado na Figura 5. A banda >220 kDa apresenta aumento de intensidade dentre os indivíduos acometidos por SS, enquanto a banda de 50kDa apresenta redução de intensidade dentre os indivíduos acometidos por SS, de acordo com a Tabela 2.

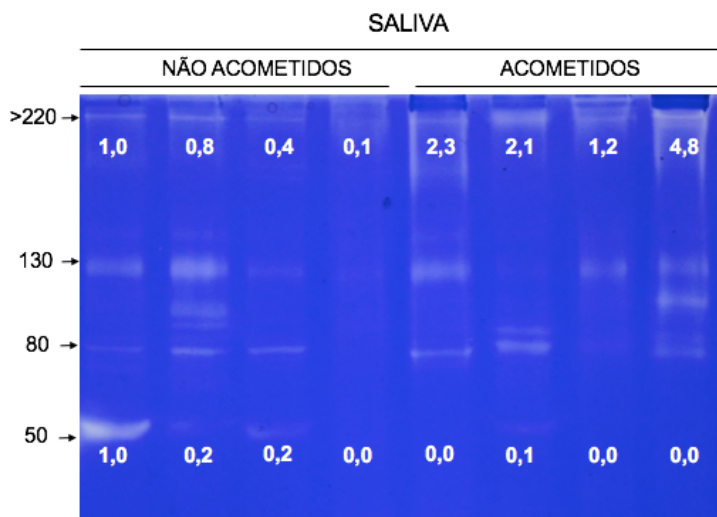


Figura 5 – Atividade proteolítica de amostras de saliva total estimulada de indivíduos não acometidos e acometidos por SS em gel de gelatina SDS PAGE 8% copolimerizado com gelatina 0,1% (w/v). Houve redução da atividade proteolítica na banda de 50kDa em indivíduos acometidos por SS em relação aos não acometidos, enquanto a banda >220 kDa apresentou aumento de atividade dentre os indivíduos acometidos por SS.

Tabela 2 - Características dos indivíduos e da atividade proteolítica associada a eles, de acordo com a condição clínica. Houve significância estatística ($p < 0,05$) na atividade específica de GP entre os grupos, bem como na intensidade das bandas de atividade gelatinolítica $>220\text{kDa}$ e 50kDa entre os grupos.

	<i>Síndrome de Sjögren</i>		<i>p*</i>
	<i>não acometidos (n = 20)</i>	<i>acometidos (n = 20)</i>	
<i>Idade (anos)</i>	47.7 $\pm$ 8.8	51.9 $\pm$ 10.7	0.183
<i>Homens (%)</i>	5.0	5.0	1.000
<i>Atividade específica (un)</i>	5.21 [3.34; 22.47]	17.15 [10.06; 26.38]	0,015
<i>Intensidade de bandas (un)</i>			
<i>>220 kDa</i>	60.92 [40.22; 98.50]	123.12 [68.66; 211.02]	0,002
<i>220 kDa</i>	9.56 [0.00; 82.76]	0.00 [0.00; 73.08]	0,738
<i>160 kDa</i>	0.00 [0.00; 63.33]	0.00 [0.00; 19.51]	0,529
<i>130 kDa</i>	25.04 [0.00; 85.99]	41.46 [0.00; 76.40]	0,862
<i>100 kDa</i>	49.78 [13.53; 98.28]	52.64 [17.95; 104.24]	0,327
<i>90 kDa</i>	0.00 [0.00; 17.99]	0.00 [0.00; 0.00]	0,445
<i>80 kDa</i>	19.20 [0.64; 71.58]	23.53 [0.00; 64.90]	0,989
<i>55 kDa</i>	0.00 [0.00; 0.00]	0.00 [0.00; 60.33]	0,565
<i>50 kDa</i>	18.56 [0.00; 93.37]	1.66 [0.00; 8.20]	0,015
<i>40 kDa</i>	0.00 [0.00; 0.00]	0.00 [0.00; 0.00]	0,799
<i>Presença de bandas (%)</i>			
<i>>220 kDa</i>	100.0	100.0	na
<i>220 kDa</i>	50.0	40.0	0.525
<i>160 kDa</i>	45.0	40.0	0.749
<i>130 kDa</i>	70.0	60.0	0.507
<i>100 kDa</i>	95.0	95.0	1.000
<i>90 kDa</i>	30.0	15.0	0.256
<i>80 kDa</i>	75.0	70.0	0.723
<i>55 kDa</i>	20.0	30.0	0.465
<i>50 kDa</i>	70.0	55.0	0.327
<i>40 kDa</i>	5.0	0.0	0.311

As bandas de atividade proteolítica em zimografia que se apresentaram mais frequentes foram a >220kDa e a 50kDa. No entanto, a frequência das diversas bandas de atividade gelatinolítica, ou seja, a constatação de se as bandas estão presentes ou ausentes no gel, não apresentou diferença significativa quando comparada entre grupo de não acometidos e acometidos por SS, de acordo com o Teste Mann-Whitney ($p>0,05$), como observado na Figura 6.

Frequência de bandas de atividade gelatinolítica

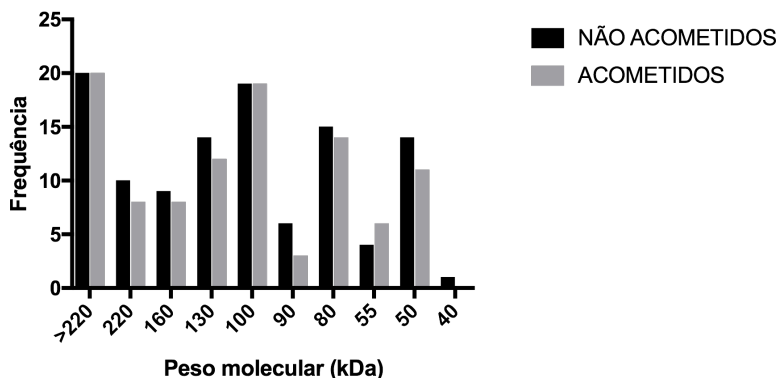


Figura 6 – Frequência de bandas de atividade gelatinolítica. Não houve diferença significativa na presença de bandas de atividade gelatinolítica, quando comparada entre grupo de não acometidos e acometidos por SS, de acordo com o Teste Mann-Whitney ($p=0,05$).

Com o propósito de identificar a classe de protease a qual se relaciona a hidrólise do substrato gelatina, em teste com saliva total estimulada de indivíduo normal, observou-se a inibição proteolítica pelo inibidor específico de metaloproteases, o EDTA (*Ethylenediamine tetraacetic acid*), como observado na Figura 7.

A inibição da atividade proteolítica salivar em zimografia não atingiu apenas a banda de aproximadamente 40kDa, a qual

não foi inibida por nenhum dos inibidores específicos testados, sendo AEBSF para serino-proteases e E-64 para cisteíno proteases (Libério *et al.* 2014). Dessa forma, dentre os inibidores específicos e clássicos de proteases, apenas a Pepstatina A não foi testada, como inibidor específico de ácido aspártico.

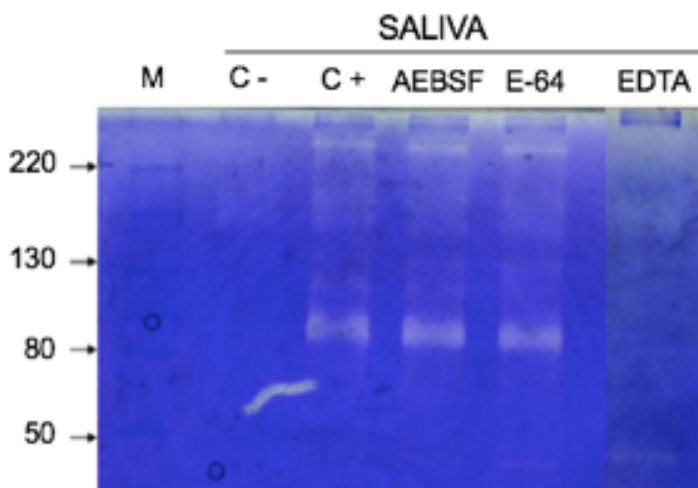


Figura 7 – Inibição de protease com inibidores específicos em substrato gelatina. Em teste com saliva total estimulada de indivíduo normal, observa-se a inibição específica por EDTA, indicando presença de metaloproteases, sendo “M” o marcador, “C-” o controle negativo, “C+” o controle positivo e “AEBSF”, “E-64” e “EDTA” os inibidores.

A atividade enzimática específica total e a intensidade das bandas apresentaram variação conforme a condição clínica, considerando indivíduos não acometidos por SS, acometidos por SS primária e acometidos por SS secundária. O resultado foi significativo ($p < 0,05$) para as mesmas bandas de atividade proteolítica que já haviam exibido significância na Tabela 2. Assim, a Tabela 3 aponta que a intensidade dos sinais varia conforme o tipo de SS, sendo SS primária ou secundária.

Tabela 3 – Avaliação da atividade enzimática salivar de acordo com a condição clínica: indivíduos não acometidos por SS e indivíduos acometidos por SS primária e secundária. Observa-se que a intensidade da atividade proteolítica de GP e de gelatina varia conforme gravidade da condição clínica, com $p < 0,05$.

	Condição clínica			p^*
	não acometidos (n = 20)	SS primária (n = 10)	SS secundária (n = 10)	
Atividade específica (un)	5.21 [3.34; 22.47]	17.15 [12.23; 25.69]	16.55 [5.73; 29.21]	0,034
Intensidade de bandas (un)				
>220 kDa	60.92 [40.22; 98.50]	105.52 [58.48; 203.02]	164.42 [66.02; 240.50]	0,001
50 kDa	18.56 [0.00; 93.37]	2.97 [0.00; 8.80]	0.00 [0.00; 15.94]	0,012

Embora a idade dos indivíduos tenha sido testada para obter-se correlações, esse dado não se mostrou relevante nos resultados, bem como quanto ao dado sexo, já que a participação de apenas 1 homem por grupo não permite constituir um grupo para comparação.

Os resultados do presente trabalho foram apresentados na 33ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica e premiado com o primeiro lugar na área 7 na modalidade Prêmio Myaki Issao (Anexo 4)

DISCUSSÃO

O fluxo salivar é fundamental para a homeostase do ecossistema bucal. Sendo assim, a hipossalivação, condição característica de pacientes com SS, afeta a lubrificação das superfícies dentais, a neutralização de ácidos, a manutenção da supersaturação da hidroxiapatita, o **clearance**, a formação da película adquirida e a defesa antimicrobiana, podendo provocar distúrbios odontológicos, como a doença cárie e a doença periodontal (Nanci 2013).

Além disso, o fluxo salivar se mostrou relevante na concentração proteica da saliva total estimulada em indivíduos não acometidos e acometidos por SS, pois sugeriu-se que há menor secreção proteica em fluxo salivar baixo nos doentes do que nos não doentes (Carpenter *et al.* 2000). Sendo assim, como os resultados da comparação de valores médios das concentrações proteicas na saliva entre os grupos avaliados no presente trabalho apresentou redução da concentração proteica de pacientes acometidos por SS, pode haver relação com a redução do fluxo salivar em ambas as coletas de grupo (Modesto 2015).

Todavia, valores padrão de amplitude de concentração proteica salivar na população mundial não estão claramente determinados, já que fatores individuais, como idade, enzimas

bacterianas e atividade proteolítica, e fatores externos, como o método de coleta, afetam a composição salivar. Dessa forma, a literatura aponta que há diferentes concentrações proteicas salivares que sejam fisiológicas (Edgar *et al.* 2012; Nunes *et al.* 2015).

Não apenas a concentração proteica, mas a composição da saliva total é importante para caracterização salivar. Com cerca de 50% do seu volume proveniente da glândula parótida, a saliva total estimulada é rica em amilase e proteínas ricas em prolina, com menor proporção de glicoproteínas, o que facilita a manipulação do fluido salivar, por ser menos viscoso (Jasim *et al.* 2016). Já a saliva não estimulada é proveniente 70% das glândulas submandibulares e sublinguais, as quais contém maior concentração de biomarcadores salivares (Nunes *et al.* 2015; Rathnayake *et al.* 2017).

Aproximadamente 27% das proteínas encontradas no plasma estão presentes na composição da saliva total, embora o fluido crevicular componha apenas 2,4% da saliva total (Spielmann *et al.* 2010). Em virtude da falta de estímulo nas glândulas salivares para coleta de saliva não estimulada em pacientes com hipossalivação, optou-se pela coleta e testes em saliva estimulada.

Nos últimos anos, diversos estudos clínicos têm avaliado a saliva total com o intuito de determinar marcadores salivares (Tvarijonaciute *et al.* 2016; Kaczar-Urbanowicz *et al.* 2017; Aqrawi *et al.* 2017). Para tal, um biomarcador ideal deve apresentar sensibilidade aos testes e especificidade à doença, sendo capaz de representar a severidade e os estágios de progressão da doença (Guerra *et al.* 2015; Porto-Mascarenhas *et al.* 2017).

Em pacientes acometidos por SS, a inflamação crônica glandular evidencia metaloproteases, possivelmente pelas alterações autoimunes no tecido glandular (Wildenberg *et al.* 2008). Na avaliação proteolítica salivar, a inibição específica por

EDTA confirmou a presença de metaloproteases, visto que o inibidor age como quelante em protease dependente de cálcio e zinco, por exemplo (Libério *et al.* 2014).

Como as MMPs do tipo gelatinases degradam não apenas gelatina, mas fibronectina e laminina, componentes da matriz extracelular (Maciejczyk *et al.* 2016), para identificação de proteases envolvidas na hidrólise desse substrato e de seus fragmentos, utilizam-se inibidores específicos capazes de impedir a hidrólise de todas essas proteínas, como EDTA, AEBSF, E-64 e Pepstatina A (Libério *et al.* 2014). Dentre os inibidores testados em zimografia de gelatina, o EDTA inibiu a maioria das bandas de atividade, indicando que metaloproteases foram inibidas de sua atividade proteolítica na presença de gelatina.

As MMPs são expressas por fatores como transformação celular, hormônios, citocinas e fatores de crescimentos. Assim, quando há um desequilíbrio entre a expressão dessas enzimas e de seus inibidores, pode ocorrer um processo patológico no qual se observa resposta inflamatória, remodelação tecidual, migração e crescimento celular (Maciejczyk *et al.* 2016). Dessa forma, essas proteases são expressas na inflamação crônica de glândulas exócrinas salivares e lacrimais em SS.

No processo inflamatório da SS são liberados MMP-1, MMP-2, MMP3 e MMP-9, dentre essas, as gelatinases são MMP-2 (gelatinase A) e MMP-9 (gelatinase B), sendo as mais prevalentes em seres humanos. Tanto as MMP-2 quanto as MMP-9 são proteases passíveis de serem visualizadas por meio da zimografia. As MMP-1 e MMP-3 podem ser visualizadas por meio de outras técnicas, como ensaios imunológicos Western Blot e ensaios fluorimétricos (Maciejczyk *et al.* 2016). Além disso, foram observadas em saliva total de ratos não obesos diabéticos com SS aumento da atividade gelatinolítica por MMP-2 e MMP-9. A expressão intensificada de MMP-9 em glândulas salivares de pacientes acometidos por SS foi relatada (Maciejczyk *et al.*, 2016; Wildenberg *et al.* 2008).

No entanto, para se afirmar que as metaloproteases presentes nas amostras de saliva total estimulada sejam MMP-2 e MMP-9, é necessária a realização de espectrometria de massa ou ensaios imunológicos, como Western Blot (Tan *et al.* 2017; Gibbons 2014).

De acordo com o banco de dados de peptidases online *Merops* (Rawlings *et al.* 2016), a protease capaz de clivar o peptídeo que possui o aminoácido prolina na posição C terminal, ou seja, em seu sítio de clivagem, como Gly-Pro-AMC, é pertencente à família de serino-proteases. Portanto, a inibição específica das amostras de saliva por AEBSF em substrato Gly-Pro-AMC confirma a presença de serino-proteases (Bastos *et al.* 2013; Libério *et al.* 2014).

As dipeptidil peptidases-4 (DPP-4), pertencentes à família prolil-oligopeptidase, da classe de serino-proteases, possui especificidade pelo substrato Gly-Pro-AMC, portanto, sugere-se que a enzima caracterizada trata-se de uma DPP-4 (Polgár *et al.* 2002). Embora a literatura já relacione o substrato hidrolisado GP pela protease DPP-4, o inibidor específico de DPP-4 é a Sitagliptina, sendo, então, o inibidor de protease capaz de determinar a presença dessa enzima (Wu *et al.* 2017).

As DPP-4 exercem funções de patogenicidade em diabetes, biologia tumoral e imunorregulação, visto que degradam peptídeos sinalizadores (Caseiro *et al.* 2012). Essas peptidases também atuam como receptores e participam dos sinais de transdução e da adesão. Assim, são encontradas no citosol, ligadas à membrana celular, o que as diferencia das demais dipeptidil peptidases (Harstad *et al.* 2013; Polgár *et al.* 2002).

Sugere-se que as DPP-4 estejam envolvidas em interações de matriz extracelular, particularmente com o colágeno (Johson *et al.* 1993), em domínio não catalítico (Löster *et al.* 1995). Além disso, a relação dessa peptidase com processos imunológicos se dá por funcionar como uma exoenzima na superfície de linfócitos (Polgár *et al.* 2002). A maior atividade

específica total da DDP-4 em pacientes acometidos pela SS no presente estudo pode, portanto, estar relacionada com processos imunológicos e inflamatórios da patogênese da SS.

Embora os inibidores de DDP-4 estejam relacionados com o aumento da secreção de insulina e a redução da degradação de peptídeos (Polgár *et al.* 2002), visto que a peptidase está associada à diabetes e à obesidade (Lessard *et al.* 2015), este estudo teve como critério de exclusão pacientes diabéticos. Por conseguinte, não há interferências da atividade proteolítica do substrato GP por essa condição sistêmica.

CONCLUSÃO

Houve diferenças nos valores médios de concentração de proteína total entre os grupos, sendo que os pacientes acometidos pela SS apresentaram menor concentração de proteína quando comparados a sujeitos normais.

Foi possível identificar atividade proteolítica em amostras salivares de indivíduos não acometidos e acometidos pela SS, bem como diferenças significativas ($p < 0,05$) na atividade enzimática de GP entre os dois grupos. A atividade proteolítica salivar de GP foi mais expressiva em pacientes acometidos pela SS que naqueles não acometidos.

Houve diferença significativa ($p < 0,05$) quanto à intensidade da atividade enzimática em gel de gelatina na banda $> 220\text{kDa}$, com aumento da atividade de acordo com a gravidade da condição clínica, e na banda 50kDa , com redução da atividade de acordo com a gravidade da condição clínica dos pacientes SS em relação aos indivíduos controle.

Sugere-se que a atividade proteolítica salivar observada com substratos fluorogênicos e inibidores específicos é devido a presença de DPP-4, da classe das serino-proteases; e em

zimografia com substrato gelatina e inibidores específicos devido a presença de metaloproteases, possivelmente MMP-2 e MMP-9.

Estudos clínicos longitudinais em amostra populacional maior deverão ser realizados no futuro, a fim de constatar o padrão de atividade proteolítica de serinoproteases e de metaloproteases em indivíduos não acometidos e acometidos por SS.

REFERÊNCIAS

- Aqrawi LA, Galtung HK, Vestad B, Øvstebø R, Thiede B, Rusthen S, Young A, Guerreiro EM, Utheim TP, Chen X, et al. 2017. Identification of potential saliva and tear biomarkers in primary Sjögren's syndrome, utilising the extraction of extracellular vesicles and proteomics analysis. *Arthritis Res Ther.* 19(1):14.
- Barone F, Colafrancesco S. 2016. Sjögren's Syndrome: from pathogenesis to novel therapeutic targets. *Clin Exp Rheumatol.* 34 (Suppl. 98): S58-S62.
- Barrett AJ, McDonald JK. 1986. Nomenclature: protease, proteinase and peptidase. *Biochemical Journal.* vol 237, p. 935
- Bastos IMD, Motta FN, Grellier P, Santana JM. 2013. Parasite Prolyl Oligopeptidases and the Challenge of Designing Chemotherapeutics for Chagas Disease, Leishmaniasis and African Trypanosomiasis. *Current Medicinal Chemistry*, 20(25).
- Bolstad AI, Skarstein K. 2016. Epidemiology of Sjögren's Syndrome – from an Oral perspective. *Curr Oral Health Rep.* 3:328–336.
- Brito-Zéron P, Baldini C, Bootsma H, Bowman SJ, Jonsson R, Mariette C, Sivils K, Theander E, Tzioufas A, Ramos-Casals. 2016. Sjögren syndrome. *Nature Reviews, Disease Primers.* 16047.
- Carlsson A, Wuttge DM, Ingvarsson J, Bengtsson AA, Sturfelt G, Borrebaeck CA, Wingren C. 2011. Serum Protein Profiling of Sistemic Lupus Erythematosus and Sistemic Sclerosis Using Recombinant Antybody Microarrays. *The American Society for Biochemistry and Molecular Biology.* 10.1074/mcp.M110.005033–1.
- Carpenter GH, Proctor BG, Pankhurst CL, O'Donohue J, Scott D, Hunnablen MP. 2000. Sialochemical markers of salivary gland involvement with Sjögren's syndrome secondary to rheumatoid

arthritis and primary biliary cirrhosis. *J Oral Pathol Med.* 29:452-9.

Caseiro A, Ferreira R, Quintaneiro C, Pereira A, Marinheiro R, Vitorino R, Amado F. 2012. Protease profiling of different biofluids in type 1 diabetes mellitus. *Clinical Biochemistry* 45(18):1613-9.

Edgar M, Dawes C, O'Mullane D. 2012. *Saliva and oral health: an essential overview for the health professional.* 4th edition. London (UK): Stephen Hancocks Limited.

Fox, RI. 2005. Sjögren's syndrome. *The Lancet* 23-29;366(9482):321-31.

Fox RI. 2016. Is salivary gland ultrasonography a usefull tool in Sjögren's Syndrome? *Rheumatology Advance.* 55(5):773-4.

González S, Sung H, Sepúlveda D, González M, Molina C. 2013. Oral manifestations and their treatment in Sjögren's syndrome. *Oral Diseases.* 20(2):153-61.

Guerra ENS, Acevedo AC, Leite AF, Gozal D, Chardin H, Canto GDL. 2015. Diagnostic capability of salivary biomarkers in the assessment of head and neck cancer: A systematic review and meta-analysis *Oral Oncology.* 51;805–818:1368-8375.

Harstad EB, Rosenblum JS, Gorrell MD, Achanzar WE, Minimo L, Wu J, Rosini-Marthaler L, Gullo R, Ordway ND, Kirby MS, et al. 2013. DPP8 and DPP9 expression in cynomolgus monkey and Sprague Dawley rat tissues. *Regulatory Peptides* 186:26–35.

Janay Gibbons. 2014. *Western Blot: Protein Transfer Overview.* *N Am J Med Sci.* 6(3): 158–159.

Jasim H, Olausson P, Hedenberg-Magnusson B, Ernberg M, Ghafouri B. 2016. The proteomic profile of whole and glandular saliva in healthy pain-free subjects *Scientific Reports.* 6:39073

- Johson RC, Zhu D, Augusti-Voss HG, Pauli BU. 1993. Lung endothelial dipeptidyl-peptidase IV is an adhesion molecule for lung-metastatic rat breast and prostate carcinoma cells. *J. Cell Biol.* 121:1423–1432.
- Kaczor-Urbanowicz KE, Deutsch O, Zaks B, Krief G, Chaushu S, Palmon A. 2017. Identification of salivary protein biomarkers for orthodontically induced inflammatory root resorption. *Proteomics Clin Appl.* 28371361.
- Katsiougianis S, Wong DTW. 2016. The Proteomics of Saliva in Sjögren's Syndrome. *Rheum Dis Clin N Am* 42. 449–456.
- Khurshid Z, Zohaib S, Najeeb S, Zafar MS, Slowey PD, Almas K. 2016. Human Saliva Collection Devices for Proteomics: An Update. *Int. J. Mol. Sci.* 17, 846.
- Lessard J, Pelletier M, Biertho L, Biron S, Marceau S, Hould FS, Lebel S, Moustarah F, Lescelleur O, Marceau P, et al. 2015. Characterization of Dedifferentiating Human Mature Adipocytes from the Visceral and Subcutaneous Fat Compartments: Fibroblast-Activation Protein Alpha and Dipeptidyl Peptidase 4 as Major Components of Matrix Remodeling *PLoS One.* 10(3):e0122065.
- Libério MS, Bastos IMD, Pires-Júnior OR, Fontes W, Santana JM, Castro MS. 2014. The Crude Skin Secretion of the Pepper Frog *Leptodactylus labyrinthicus* Is Rich In Metallo and Serine Peptidases. *PLoS ONE.* 9(6):e96893.
- Liu CC, Manzi S, Ahearn JM. 2005. Biomarkers for systemic lupus erythematosus: a review and perspective. *Curr. Opin. Rheumatol.* 17, 543–549.
- Löster K, Zeilinger K, Schuppan D, Reutter W. 1995. The cysteine-rich region of dipeptidyl-peptidase IV (CD26) is the collagen-binding site. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 217: 341–348.

- Maciejczyk M, Pietrzykowska A, Zalewska A, Knás M, Daniszewska I. 2016. The Significance of Matrix Metalloproteinases in Oral Diseases. *Adv Clin Exp Med* 25, 2, 383–390.
- Mal M. 2016. Noninvasive metabolic profiling for painless diagnosis of human diseases and disorders. *Future Sci. OA* 2(2), FSO106.
- Merops: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. Cambridge (UK): EMBL-European Bioinformatics Institute, Cambridge [acesso em 25 abr 2017]. merops.sanger.ac.uk
- Modesto FMB. 2015. Manifestações bucais e qualidade de vida na Síndrome de Sjögren [tese]. [Brasília (DF)]: Universidade de Brasília.
- Nanci, A. 2013. Ten Cate – Histologia Oral. 8ª edição. Rio de Janeiro (BRA): Editora Elsevier.
- Nunes LAS, Sayeeda M, Omana SB. 2015. Clinical and diagnostic utility of saliva as a non-invasive diagnostic fluid: a systematic review. *Biochem Med (Zagreb)*. 25(2):177-92.
- Polgár CMLS. 2002. The prolyl oligopeptidase family L. *Cell. Mol. Life Sci*. 59:349–362 1420-682X/02/020349-14
- Porto-Mascarenhas EC, Assad DX, 2017. Chardin H, Gozalf D, Cantog GDL, Acevedo AC, Guerra ENS. Salivary biomarkers in the diagnosis of breast cancer: A review. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 110 (2017) 62–73.
- Rathnayake N, Gieselmann DR, Heikkinen AM, Tervahartiala T, Sorsa T. 2017. Salivary Diagnostics – Point-of-Care diagnostics of MMP-8 in dentistry and medicine. *Diagnostics*. 7, 7.
- Rawlings ND, Barrett AJ, Finn R. 2016. Twenty years of the MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Res* 44, D343-D350

- Santana JM, Grellier P, Schrevel J, Texeira AR. 1997. A Trypanosoma cruzi-secreted 80 kDa proteinase with specificity for human collagen types I and IV. *Biochemical Journal*. 324, 129-137.
- Spielmann N, Wong DT. 2011. Invited Medical Review. Saliva: diagnostics and therapeutic perspectives. *Oral Diseases* 17, 345–354.
- Tan BC, Lim YS, Lau SE. 2017. Proteomics in commercial crops: An overview. *Journal of Proteomics*, 1874-3919.
- Tvarijonaviciute A, Aznar-Cayuela C, Rubio CP, Ceron JJ, López-Jornet P. 2016. Evaluation of salivary oxidate stress biomarkers, nitric oxide and C-reactive protein in patients with oral lichen planus and burning mouth syndrome. *J Oral Pathol Med*. 8.10.1111/jop.12522.
- Vitali C, Bombardieri S, Jonsson R, MOutpoulos HM, Alexander EL, Carsons SE, Daniels TE, Fox PC, Fox RI, European Study Group on Classification Criteria for Sjögren's Syndrome, et al. 2002. Classification criteria for Sjögren's Syndrome: a revised version of the European criteria proposed by the American-European Consensus Group. *Ann Rheum Dis* 61:554–558.
- Wildenberg ME, van Helden-Meeuwsen CG, Drexhage HA, Versnel MA. 2008. Altered fractalkine cleavage potentially promotes local inflammation in NOD salivary gland. *Arthritis Research & Therapy*. 10(3):R69.
- Wu C, Hu S, Wang N, Tian J. 2017. Dipeptidyl peptidase-4 inhibitor sitagliptin prevents high glucose-induced apoptosis via activation of AMP-activated protein kinase in endothelial cells. *Molecular Medicine Reports*. Volume 15 Issue 6, 4346-4351.
- Zhang CZ, Cheng XQ, Li JY, Zhang P, Yi P, Xu X, Zhou XD. 2016. Saliva in the diagnosis of diseases. *International Journal of Oral Science*. 8, 133–137.

ANEXOS

ANEXO I: NORMAS DA REVISTA

The Journal of Dental Research accepts the following types of manuscripts for consideration:

Original Research Reports: These manuscripts are based on clinical, biological, and biomaterials and bioengineering subject matter. Manuscripts submitted as research reports have a limit of 3,200 words (including introduction, materials, methods results, discussion and; excluding abstracts, acknowledgments, figure legends and references); a total of 5 figures or tables; 40 references; and must contain a 300 word abstract.

All submissions must include a title page and be accompanied by a cover letter and list of suggested reviewers. Cover letters should certify the research is original, not under publication consideration elsewhere, and free of conflict of interest. Title pages should include: abstract word count, total word count (Abstract to Acknowledgments), total number of tables/figures, number of references, and a minimum of 6 keywords. Keywords cannot be words that have been included in the manuscript title. Key words should be selected from Medical Subject Headings (MeSH) to be used for indexing of articles. See: <http://www.nlm.nih.gov/mesh/MBrowser.html> for information on the selection of key words.

Please submit the names and email addresses of four preferred reviewers when prompted by the SAGE Track system. Preferred reviewers cannot be colleagues at the contributors' institution or present or former collaborators.

TITLES: Titles can consist of a maximum of 75 characters (including spaces). Titles do not normally include numbers, acronyms, abbreviations or punctuation. The title should include sufficient detail for indexing purposes but be general enough for readers outside the field to appreciate what the paper is about.

ACKNOWLEDGMENTS: Authors are required to report all sources of support for their project or study, including but not limited to: grant funds, commercial sources, funds from a contributors' institution. Do not refer to a study being "partially funded by the cited sources." Consultancies and funds paid directly to investigators must also be listed. Authors are required to specify during the submission process if their paper received funding from NIH, NIDCR, or any other NIH Institute or Center and provide the grant number. To comply with the NIH Public Access Mandate, for qualifying NIH funded papers, the Journal of Dental Research will deposit the final, copyedited paper to PubMed Central on behalf of the authors. Any perceived or actual conflicts of interest need to be identified in the acknowledgments section. The JDR abides by the International Committee of Medical Journal Editors guidelines for the Ethical Considerations in the Conduct and Report of Research (<http://www.icmje.org>). Authors are requested to include this information in the acknowledgments section and the corresponding author must confirm that all co-authors have reported any potential conflicts.

FIGURE AND TABLE REQUIREMENTS: These guidelines are intended to aid authors in providing figures that will reproduce well in both print and online media. Submitting digital image files that conform to these guidelines will prevent delays in the review and publication processes, and maximize the published quality of your figures.

Figure Types: JDR figures can fall into one of three categories: Continuous-tone images, Line-art images, and Combination images. Each image type has specific requirements in terms of the resolution needed for publication and the file types best suited for the figure.

Resolution: In order for a figure to be used in publication, its Digital Image File must have the required resolution when it is created. The resolution cannot be raised after the original image is made. Attempting to do so (for example, with Adobe Photoshop's® "Image Size" command) results in the addition of artificial pixels that distort the image and lower its sharpness.

Fonts: Limit fonts used in any figure to Times, Times New Roman, Arial, Frutiger, and Sabon. Other fonts cannot be guaranteed to reproduce properly. Files containing figures and tables should be clearly labeled to indicate their placement in the text or appendix. Tables should be viewable in a portrait view. Tables that are created in a landscape view are more suitable for an appendix. If the online version is in color and the printed version in black and white, please submit separate files for each version. Figures should be identical except in color or grayscale. The cost of color figures in the print version will be borne by the authors. Rates for color reproduction are \$300 per initial page of color and \$150 for each additional page of color. However, there are no charges for figures and diagrams printed in black and white. Color figures may be included in the online version of JDR with no extra charges.

REFERENCES: The Journal of Dental Research (JDR) adheres to the CSE (8th Edition) editorial style. All submitted manuscripts should be formatted in this style: <http://www.scientificstyleandformat.org/Tools/SSFCitation-Quick-Guide.html>. **SUPPLEMENTAL FILES** Additional supporting data may be referenced as a supplemental appendix for publication

online only. All supplemental appendix files must be submitted with the manuscript for review. Supplementary files will be subjected to peer-review alongside the article.

SUPPLEMENTAL FILES: Additional supporting data may be referenced as a supplemental appendix for publication online only. All supplemental appendix files must be submitted with the manuscript for review. Supplementary files will be subjected to peer-review alongside the article. Supplementary files will be uploaded as supplied. They will not be checked for accuracy, copyedited, typeset or proofread. The responsibility for scientific accuracy and file functionality remains with the authors. A disclaimer will be displayed to this effect with any supplementary material published. Supplemental files may include additional figures or tables that exceed the Journal's limit. Material intended for the supplemental appendix must have "supplemental" or "appendix" in the file name upon upload. When formatting your supplemental files, please follow these instructions: • Authors should provide a single Word file with all Appendix content. Figures and tables should be included in the main Appendix file so they can appear immediately alongside their captions. High resolution figures may also be supplied separately if authors wish, but they also must be copied into the Word file so everything can be kept together.

- Be sure to run spell check and proofread the text.
- Remove all highlighting/other colors. Use one font throughout.
- The Appendix should include the title of the article and all authors. Page numbers are recommended.
- Figures and Tables should be labeled Appendix Figure/Table 1, Appendix Figure/Table 2, etc. Avoid labeling as S1, S2, and so forth. All table footnotes and figure legends should be included.
- Preferably, authors shouldn't label separate parts as "Appendix 1", "Appendix 2", etc.; just use section heads as in a regular article.

Language Editing: Manuscripts submitted for publication consideration should be written in English. Prior to submission, if a manuscript would benefit from professional editing, authors may consider using a language-editing service. Suggestions for this type of service can be found at www.iadr.org/EditingServices. The Journal of Dental Research does not take responsibility for, or endorse these services, and their use has no bearing on acceptance of a manuscript for publication.

ANEXO II - APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



Universidade de Brasília
Faculdade de Ciências da Saúde
Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/FS

PROCESSO DE ANÁLISE DE PROJETO DE PESQUISA

Registro do Projeto no CEP: **073/11**

Título do Projeto: “Avaliação de Biomarcadores Salivares em Pacientes com Síndrome de Sjögren Secundária”.

Pesquisadora Responsável: Flávia Marques Borba Modesto

Data de Entrada: 27/05/11

Com base na Resolução 196/96, do CNS/MS, que regulamenta a ética em pesquisa com seres humanos, o Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, após análise dos aspectos éticos e do contexto técnico-científico, resolveu **APROVAR** o projeto **073/11** com o título: “Avaliação de Biomarcadores Salivares em Pacientes com Síndrome de Sjögren Secundária”, analisado na 5ª reunião ordinária realizada no dia 14 de junho de 2011.

A pesquisadora responsável fica, desde já, notificada da obrigatoriedade da apresentação de um relatório semestral e relatório final sucinto e objetivo sobre o desenvolvimento do Projeto, no prazo de 1 (um) ano a contar da presente data (item VII.13 da Resolução 196/96).

Brasília, 21 de julho de 2011.

Thiago Rocha da Cunha
Vice - coordenador do CEP-FS/UnB

ANEXO III - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

VOCÊ ESTÁ SENDO CONVIDADO A PARTICIPAR da pesquisa intitulada Avaliação de Biomarcadores salivares em pacientes com Síndrome de Sjögren Secundária. A Síndrome de Sjögren é uma doença caracterizada, principalmente, pela destruição das glândulas salivares e das glândulas lacrimais. O paciente com diminuição da saliva e da lágrima sente sua boca seca e seus olhos secos. Essa diminuição da saliva pode causar rachaduras e ressecamento nos lábios e feridas nas bochechas e na língua. A saliva é de especial importância para o controle da doença cárie e quando há deficiência na produção de saliva ocorre um aumento das lesões de cárie.

Por esse motivo, decidiu-se fazer uma pesquisa para avaliar a quantidade e a qualidade da saliva de pacientes com Síndrome de Sjögren e dessa maneira identificar proteínas salivares que facilitem o diagnóstico e o tratamento da Síndrome de Sjögren.

A análise das proteínas da saliva é um procedimento simples e não apresenta qualquer risco para os pacientes. Primeiramente, o paciente será agendado para uma consulta no ambulatório de Odontologia do Hospital Universitário de Brasília. Durante essa consulta o paciente será submetido a um exame odontológico de rotina, responderá a um questionário sobre a sensação de secura da boca e por fim, será coletada uma amostra de saliva. O paciente poderá recusar-se a responder questões que considere constrangedoras durante a aplicação do questionário. Para a coleta de saliva o paciente deverá mascar uma goma de chiclete sem gosto e sem cheiro por cinco minutos e deverá cuspir toda a saliva produzida em um recipiente próprio. A saliva coletada será transportada para o laboratório, analisada e descartada. Essa coleta é rápida e não causa nenhum desconforto aos pacientes.

A análise das proteínas da saliva pode ser prejudicada se os pacientes se alimentarem ou beberem, mesmo água, no período anterior à coleta. Por isso, pede-se ao paciente que faça jejum por 1 hora e suspenda qualquer medida de higiene da boca no dia da consulta.

Poderão também ser utilizados resultados de exames, dados clínicos e informações concernentes à Síndrome de Sjögren contidos nos prontuários médicos dos pacientes.

Aos pacientes não incidirão quaisquer custos ou gastos. Todos os pacientes abrirão prontuário odontológico e receberão tratamento dentário, dentro dos limites do serviço.

A qualquer tempo, durante o curso da pesquisa, você poderá pedir quaisquer outras informações ou ainda retirar o consentimento em qualquer fase, e saiba que mesmo recusando-se a continuar na pesquisa, não será penalizado, nem perderá os benefícios oferecidos.

Todas as fotografias, imagens e resultados de exames ou quaisquer outras informações concorrentes à pesquisa, assegurado o sigilo do paciente, constituem propriedade da pesquisadora, que terá pleno direito de retenção, uso para fins de ensino e de divulgação em jornais e revistas científicas do país ou estrangeiro, respeitando os respectivos códigos de ética.

Este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido encontra-se redigido em duas vias, sendo uma do paciente e outra da pesquisadora. Qualquer dúvida, favor contatar a pesquisadora responsável Flávia Marques Borba Modesto no telefone (61)3435-3791 ou ainda o Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília no telefone (61)3107-1947.

Brasília, ____/____/____.

Sujeito da Pesquisa

Flávia Marques Borba Modesto
Pesquisadora Responsável

ANEXO IV - PREMIAÇÃO DA 33ª REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE PESQUISA ODONTOLÓGICA

33ª REUNIÃO ANUAL

7 a 10 de setembro de 2016 - Campinas - SP

CERTIFICADO

Certificamos que

o trabalho PT0130 - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA SALIVAR DE PACIENTE COM
SÍNDROME DE SJÖGREN de CHAGAS LGAA, PAULA LM, BASTOS IMD, ACEVEDO AC
foi PRIMEIRO LUGAR na área 7 na modalidade Prêmio Myaki Issao

na 33ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica, no período de 7 a
10 de setembro de 2016, em Campinas – SP – Brasil.

Carlos Eduardo Franco

Carlos Eduardo Franco
Vice-Presidente

Altair Antoninha Del Bel Cury

Presidente

