



Identificação de proteínas expressas na saliva de indivíduos expostos à alta dosagem de fluoreto nas águas

Bianca Golzio Navarro Cavalcante¹; Rafael Mafaldo Bezerra¹; Rayanne Rilka Pereira da Silva²; Consuelo Fernanda Macedo de Souza¹; Maria Soraya Pereira Franco da Silva¹.

¹Universidade Federal da Paraíba; ² Universidade Federal de Campina Grande – msorayapf@hotmail.com

Resumo: O flúor é um elemento químico que em concentrações baixas, proporciona efeitos benéficos nos dentes, mas a exposição excessiva ao fluoreto através da ingestão de água a longo prazo, pode causar doenças sistêmicas como a fluorose óssea. O baixo número de casos confirmados de fluorose óssea refletem a deficiência de biomonitoramento e conhecimento do impacto da doença na saúde pública. Dessa forma, o campo da proteômica se apresenta como opção para estudo da expressão proteica, trazendo a expectativa de que exposições antes desconhecidas ou não esperadas, possam ser identificadas e as proteínas diferencialmente expressas possam dar as informações para elucidar o mecanismo da fluorose. Trata-se de um estudo epidemiológico, observacional, descritivo e transversal, baseado em dados quantitativos, com análise estatística e procedimento comparativo e descritivo. O estudo foi realizado na vila de Brejo das Freiras, no município de São João do Rio do Peixe (PB), local que apresenta elevada concentração de flúor em todos os poços naturais. A amostra foi constituída de 27 indivíduos com os casos mais graves identificados pelo perfil epidemiológico traçado, através de questionário semi-estruturado e pré-validado sobre sintomatologia de dores articulares. A coleta da saliva, foi obtida através da secreção da glândula parótida, ou das glândulas salivares menores, com estímulos mecânicos ou químicos, a depender se os pacientes tinham hipossalivação. As amostras foram sempre coletadas em um mesmo período do dia, das 10 às 14 horas, considerando o ciclo circadiano, e imediatamente centrifugadas na residência do voluntário, e armazenadas em nitrogênio líquido até sua análise no laboratório de bioquímica da USP, para preparação para espectrometria de massa. Foi realizada a dosagem das proteínas com o método Bradford modificado antes da espectrometria. Para obtenção dos espectros de massas, as amostras foram utilizadas no sistema nanoACQUITY UPLC (Waters, Milliford, USA) acoplado ao espectrômetro de massas Xevo Q-TOF G2 (Waters, Milliford, USA). Os dados obtidos foram buscados no banco de dados do UniProt (Universal Protein Resource). O presente estudo é provavelmente o primeiro a explorar *in vivo* análise proteômica para fluorose óssea no solo brasileiro, e ressalta-se que 15 indivíduos eram portadores de FO. Dessa forma, obteve-se como resultado da análise proteômica na saliva a identificação de 109 proteínas e destas, 72 pertencem ao grupo G1 (com fluorose óssea), 22 pertenciam ao G2 (sem fluorose óssea) e 15 eram comuns a ambos. Nenhuma das proteínas identificadas e comuns a G1_G2 tiveram expressão significativa, no entanto o G1 apresenta proteínas alteradas e subexpressas, quando relacionada ao G2. Há necessidade de investigação para averiguar se a subexpressão dessas proteínas resulta da interferência da alta concentração de F nestes indivíduos. Devido ao número baixo de amostras de saliva advindas da glândula parótida e, sobretudo, ao transporte do material biológico, a alteração destas pode ter ocorrido, considerando a sensibilidade da técnica de análise proteômica, justificando o baixo número de proteínas significativamente expressas ou subexpressas. Espera-se, que com a identificação dessas proteínas envolvidas nos processos metabólicos do flúor, possamos elucidar o metabolismo desse íon bem como identificar indivíduos mais vulneráveis à fluorose óssea.

Palavras-chave: Proteômica. Fluorose. Espectrometria de Massas. Biomarcadores. Saliva

INTRODUÇÃO

O flúor é um elemento químico que, se associado em concentrações baixas, proporciona efeitos benéficos nos dentes, mas a exposição excessiva ao fluoreto através da ingestão de água a longo prazo, ou até combinação com a exposição à outras fontes, excedendo as necessidades fisiológicas, aumenta o



número de efeitos adversos, podendo causar doenças sistêmicas. Estes efeitos variam de fluorose dentária suave até fluorose esquelética e desordens músculo-esqueléticas, de acordo com o aumento do nível de exposição ao fluoreto e período de tempo. A fluorose crônica além de afetar ossos e dentes, tem efeitos deletérios significativos nas funções cardiovascular, respiratória, gastrointestinal, endócrina e neurológica (FAN et al., 2015; KHURDI, 2016; WAUGH et al., 2016; WHO, 2006).

Muitos estudos epidemiológicos relacionados à exposição a longo prazo ao fluoreto foram conduzidos em vários países, mas, embora existam diversos estudos epidemiológicos disponíveis, a quantidade de dados distintos torna difícil determinar uma relação clara entre exposição - resposta (WHO, 2006).

O baixo número de casos confirmados de fluorose clínica e subclínica refletem a deficiência de biomonitoramento e conhecimento do impacto da doença na saúde pública (WAUGH et al., 2016).

Devido à nossa individualidade molecular, são necessários arranjos de marcadores para compor a base de modelos probabilísticos de diagnósticos diferenciados e personalizados. A caracterização dos biomarcadores selecionados é condição necessária para a utilização dos padrões moleculares no auxílio de diagnósticos, prognósticos e também para fornecer maiores conhecimentos, ao nível molecular, sobre a patologia em questão (CARVALHO et al., 2006).

Dessa forma, o campo da proteômica se apresenta como opção para estudo da expressão protéica, trazendo a expectativa de que exposições antes desconhecidas ou não esperadas, possam ser identificadas e as proteínas diferencialmente expressas possam dar as informações para elucidar o mecanismo da fluorose, e assim identificar novos alvos para intervenção terapêutica. A tecnologia do proteoma, aliada à bioinformática, poderá trazer impacto direto na clínica médica e qualidade de vida dos pacientes. (CARVALHO et al., 2006; METZ et al., 2017; SOARES et al., 2007; WEY et al., 2016).

A integração da química, bioquímica, biologia molecular, espectrometria de massa e bioinformática é essencial para o desenvolvimento da nova geração de ferramentas que possibilitarão um melhor entendimento dos complexos de proteínas e suas funções encontradas, para um diagnóstico mais preciso e, conseqüentemente, o tratamento adequado da doença (KAAKE; WANG; HUANG, 2010).

Com a dificuldade em confirmar o diagnóstico de fluorose óssea, a busca por biomarcadores específicos, viáveis, sensíveis, seguros e de baixo custo para o diagnóstico



dessa morbidade, poderá proporcionar o melhor entendimento dessa patologia, facilitando a adoção de medidas preventivas e terapêuticas, bem como o diagnóstico precoce da doença. A verificação das alterações metabólicas, biológicas, fisiológicas e patológicas da FO, com o biomonitoramento da exposição ao flúor através da saliva e a introdução da pesquisa molecular na busca de expressão proteica, permitirá conhecer o efeito e susceptibilidade do indivíduo a este agente químico, indicando o nível atual do organismo frente a essa condição, propiciando o conhecimento e o perfil dessa morbidade. Além disso, informações sobre a doença, incluindo as manifestações clínicas, diagnóstico e tratamento são desconhecidos da maioria dos profissionais de saúde.

Existem poucos trabalhos científicos com estudos epidemiológicos e de biomarcadores de flúor em comunidades rurais, uma vez que a maioria das pesquisas é restrita ao ambiente laboratorial e, portanto, não procede a avaliações aplicadas na comunidade (LIMA JUNIOR, 2012).

Por fim, é importante ressaltar que esta pesquisa revelará um impacto regional, econômico e social, na medida que busca aplicação de ferramentas e novos protocolos relacionados à essa doença pioneira no país, melhorando assim a qualidade de vida das comunidades rurais do semiárido brasileiro acometidas pela doença.

2. METODOLOGIA

Trata-se de um estudo epidemiológico, observacional, descritivo e transversal, baseado em dados quantitativos, com análise estatística e procedimento comparativo e descritivo (MARCONI; LAKATOS, 2009). O estudo seguiu a Resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde do Brasil (BRASIL, 2012), com a emissão do protocolo da Plataforma Brasil número 1256646.

O estudo foi realizado na vila de Brejo das Freiras, no município de São João do Rio do Peixe (PB), distante cerca de 500 km da capital João Pessoa, local que apresenta elevada concentração de flúor em todos os poços naturais.

2.1. Critérios de inclusão

Área endêmica para fluorose dentária; indivíduos que apresentassem capacidade de compreensão e de comunicação verbal; voluntários residentes permanentes na vila que utilizaram a água do poço para o consumo nessa localidade, com idade mínima de 20 anos.

2.2. Amostra

Foi constituída de 27 indivíduos com os casos mais graves identificados pelo perfil epidemiológico traçado, através de questionário semi-



estruturado e pré-validado sobre sintomatologia de dores articulares (pés, mãos, punho, coluna, dores renais). De acordo com a existência de mais de 4 sintomas, os indivíduos cuja radiografia apresentaram positivo a confirmação do diagnóstico de fluorose esquelética, foram monitorados em seus biomarcadores salivares e proteômicos.

2.3. Obtenção da saliva para análise proteômica

A coleta da saliva, foi obtida através da secreção da glândula parótida. Uma vez que os voluntários da pesquisa são em maioria idosos, e poderiam apresentar xerostomia ou redução do fluxo salivar devido à idade mais avançada, quando não possível essa técnica, foi realizada a obtenção da coleta de saliva total, através do método de coleta estimulada quimicamente.

Para esta coleta, os voluntários foram orientados evitar comer, beber, fumar e usar produtos de higiene oral pelo menos uma hora antes da coleta, para evitar interferentes. Concomitante, outros fatores tiveram que ser adequados, pois o fluxo salivar apresenta normalmente alterações durante o dia. Por essa razão, as amostras foram sempre coletadas em um mesmo período do dia, das 10 às 14 horas. Dentro do protocolo utilizado, procurou-se padronizar ao máximo a coleta das amostras, para diminuir as variáveis interferentes.

2.3.1. Obtenção das amostras através da glândula parótida

Sob estimulação com ácido cítrico, foram coletadas amostras de saliva diretamente da abertura do "Ducto de Stenon", do lado direito da boca, utilizando-se coletores de saliva estéreis acoplados à sonda uretral número 6.

Uma pera de borracha conectada à sonda, quando pressionada, produz um vácuo no coletor. No momento em que este coletor era adaptado à saída do ducto, a pressão sobre a pera era liberada, para que o coletor se fixasse à bochecha sob pressão negativa. Aguardava-se, então, a saída da saliva através da sonda. Quantidades mínimas de saliva (2ml) eram suficientes para a realização dos ensaios. As amostras de saliva foram coletadas em tubos de *Eppendorfs*, imediatamente centrifugadas na residência do voluntário, o sobrenadante eliminado e armazenadas em nitrogênio líquido e, posteriormente, em -80° C até sua análise no laboratório de bioquímica da USP. Foram acondicionadas em caixa térmica e transportadas com gelo seco até o local determinado para preparação para espectrometria de massa.

2.4. Dosagem das Proteínas

Estando as amostras preparadas, antes de submetê-las a espectrometria de massas, foi realizada a dosagem das mesmas, com o intuito de avaliar a quantidade de proteínas totais obtidas em cada amostra coletada permitindo assim,



estabelecer a quantidade mínima necessária para etapa subsequente.

Assim, o método utilizado para realizar a dosagem foi o Bradford modificado (kit Quick Start Bradford, Bio-Rad). Considerando que o Bradford original é incompatível com os reagentes presentes nos tampões de primeira dimensão, como uréia, tiouréia, CHAPS, foi necessário o uso de métodos quantitativos específicos e modificados.

Para obtenção dos espectros de massas, as amostras foram utilizadas no sistema nanoACQUITY UPLC (Waters, Milliford, USA) acoplado ao espectrômetro de massas Xevo Q-TOF G2 (Waters, Milliford, USA). A identificação das proteínas foi obtida através do algoritmo de contagem de íons incorporado ao *software*. Os dados obtidos foram buscados no banco de dados da espécie *Homo sapiens* (ID UP000005640) baixado do catálogo do UniProt (Universal Protein Resource). Os resultados obtidos foram tabulados e apresentados em forma de tabelas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram analisadas 27 amostras de saliva em indivíduos expostos ao flúor na água. A tabela 01 apresenta as dosagens de proteínas presentes na saliva, com a exigência de apresentar um volume mínimo de 50µL (1 µg/L) para serem preparadas para digestão com a tripsina para análise proteômica.

Tabela 01: Dosagem de proteínas da saliva (n= 27) e o volume da amostra a ser utilizada para o preparo para MS.



Dosagem de proteínas na saliva				
Amostra G1 e G2	A _{480nm} *	[P ₃₀] µg/µL	Diluição amostra (1x)	Vol. (µL) p/ 50 µg p ₃₀ **
1 CFO ^a	0,152	112,01	1	446,37
2 CFO ^a	0,205	179,93	1	277,89
3 CFO ^a	0,100	45,38	1	1101,73***
4 CFO ^a	0,124	76,14	1	656,72
5 CFOP ^a	0,201	174,16	1	287,09
6 CFO ^a	0,110	57,56	1	868,72
7 CFO ^a	0,070	6,94	1	7202,48
8 CFO ^a	0,102	47,31	1	1056,97***
9 CFO ^a	0,460	506,04	1	98,81
10 CFO ^a	0,232	213,88	1	233,77
11 CFO ^a	0,148	106,89	1	467,78
12 CFO ^a	0,217	194,66	1	256,85
13 CFO ^a	0,547	617,51	1	80,97
14 CFO ^a	0,116	65,89	1	758,90
15 CFO ^a	0,141	97,28	1	513,99
16 SFO ^b	0,311	315,75	1	158,35
17 SFO ^b	0,317	322,80	1	154,89
18 SFOP ^b	0,254	242,07	1	206,55
19 SFO ^b	0,671	777,05	1	64,35
20 SFO ^b	0,295	295,25	1	169,35
21 SFO ^b	0,325	333,05	1	150,13
22 SFO ^b	0,279	274,75	1	181,98
23 SFO ^b	0,149	108,17	1	462,23
24 SFO ^b	0,233	215,81	1	231,69
25 SFO ^b	0,206	181,21	1	275,93
26 SFOP ^b	0,422	457,34	1	109,33
27 SFO ^b	0,212	188,90	1	264,70

3.1. Análise proteômica da saliva

Quanto à análise proteômica na saliva de indivíduos pertencentes aos grupos G1 (COM FLUOROSE) e grupo G2 (SEM FLUOROSE), expostos às elevadas concentrações de flúor na água, foram obtidas um total de 109 proteínas. Destas pertenciam somente ao grupo G 1 um total de 72, somente ao G2 um total de 22 e comum aos dois grupos foram identificadas 15 proteínas, de acordo com a tabela 02. As médias e o desvios-padrão foram identificados para cada grupo, considerando a exposição a dose crônica do F de 4,46 mg/L na comunidade pesquisada.

Tabela 2: Apresentação da quantificação proteômica da saliva (n= 27), com o escore da proteína. Brasil (2015).



	Nº de ptn Identificadas	Nº de ptn Identificadas G1	Nº de ptn Identificadas G2	Nº de ptn Identificadas G1 e G2 *
Nº Amostra	109	72	22	15
Valor Mín	35,05	35,01	141,87	331,69
Valor Máx	4.881	4881,22	1331,11	1453,21
Média	445,6	317,19	597,77	647,82
(±DP)	537,3	559,91	345,51	460,20

* proteínas identificadas pertencentes aos dois grupos 1 e 2.

A tabela 3 exibe as proteínas que apresentaram expressão diferencial quando comparadas metabolicamente entre G1 e G2 nas amostras de saliva. Para tanto dispõe o número do acesso da proteína nos bancos de dados da UNIPROT, descrição da proteína, o valor do escore da proteína como também indica qual o grupo que exibe maior alteração quando comparadas as análises da saliva entre as amostras e a variância.

Tabela 03: Lista das proteínas identificadas na saliva, comum aos dois grupos G1 e G2, expostos a 4,46 mg/L de F, identificadas por MS. (Ptn= proteína).

Número do acesso ^a	Descrição da Proteína ^b	Escore ^c	ptn Saliva ^d G1 G2	p ^e
G3V1R1	Basic peptide IB-6 OS=Homo sapiens GN=PRB1 PE=4 SV=1	331,69	G1_G2	0,8
G3V1M9	Basic salivary proline-rich protein 1 OS=Homo sapiens GN=PRB1 PE=4 SV=2	430,34	G1_G2	0,74
A0A087X024	Basic salivary proline-rich protein 1 OS=Homo sapiens GN=PRB1 PE=4 SV=1	430,34	G1_G2	0,71
P02814	Submaxillary gland androgen-regulated protein 3B OS=Homo sapiens GN=SMR3B PE=1 SV=2	474,46	G1_G2	0,61
A0A075B6N7	Ig alpha-2 chain C region (Fragment) OS=Homo sapiens GN=IGHA2 PE=4 SV=1	1453,21	G1_G2	0,59
P02810	Salivary acidic proline-rich phosphoprotein 1/2 OS=Homo sapiens GN=PRH1 PE=1 SV=2	399,19	G1_G2	0,56
P01877	Ig alpha-2 chain C region OS=Homo sapiens GN=IGHA2 PE=1 SV=3	1453,21	G1_G2	0,55
P01876	Ig alpha-1 chain C region OS=Homo sapiens GN=IGHA1 PE=1 SV=2	1453,21	G1_G2	0,54
A0A087WV42	Salivary acidic proline-rich phosphoprotein 1/2 OS=Homo sapiens GN=PRH1 PE=4 SV=1	399,19	G1_G2	0,51
A0A0A0MT31	Salivary acidic proline-rich phosphoprotein 1/2 OS=Homo sapiens GN=PRH1 PE=4 SV=1	399,19	G1_G2	0,49
A0A087WYT0	Salivary acidic proline-rich phosphoprotein 1/2 OS=Homo sapiens GN=PRH1 PE=4 SV=1	399,19	G1_G2	0,49
A0A087WYF5	Salivary acidic proline-rich phosphoprotein 1/2 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=PRH1 PE=4 SV=1	399,19	G1_G2	0,48
A0A087WZY1	Salivary acidic proline-rich phosphoprotein 1/2 OS=Homo sapiens GN=PRH1 PE=4 SV=1	399,19	G1_G2	0,45
P15516	Histatin-3 OS=Homo sapiens GN=HTN3 PE=1 SV=2	1026,31	G1_G2	0,02 ^f
X6RAH8	Histatin-3 OS=Homo sapiens GN=HTN3 PE=4 SV=1	1026,31	G1_G2	0,01 ^f



^a acesso da proteína nos bancos de dados UniProtKB; ^b descrição da proteína identificada, ^c o valor do escore da proteína; ^d indicação da proteínas comum entre os grupos; indicação do grupo que a proteína exibir alteração diferenciada; variância ^e e proteínas que apresentaram entre o grupo comum expressão diferencial (menos expressa).

Este trabalho descreve a primeira determinação proteômica em saliva em humanos expostos às elevadas concentrações de flúor pela água de beber, e com potencial para causar fluorose óssea, ressalta-se que quinze indivíduos eram portadores de FO.

Devido à hipossalivação dos pacientes, das 27 amostras, 22 foram obtidas pelo método de estimulação química. Assim, em meio à dificuldade encontrada para obtenção de uma saliva livre de interferente e contaminante, só foi possível a coleta em poucos pacientes (n=5), obtidas diretamente da glândula parótida.

Dessa forma, obteve-se como resultado da análise proteômica na saliva a identificação de 109 proteínas, destas 67% pertence ao grupo G1, 21,3% pertenciam ao G2 e 13,7 % das proteínas identificadas eram comuns aos dois grupos.

Porém, ao comparar os dois grupos, constata-se que o grupo 1, apresentavam proteínas alteradas, quando relacionada ao grupo pareado (G1_G2). Destas apresentaram um escore médio de 647,82 (DP \pm 460,2), valor mínimo de (331,7) valor mínimo (1.453) No tocante a diferença de expressão evidenciada do grupo G1 em relação ao G2, das 15 proteínas identificadas exibindo valor médio de 0,57 (DP \pm 0,11), valor mínimo de (0,45), valor máximo (0,8), constatou que nenhuma destas proteínas identificadas e comum aos dois grupos analisados apresentaram expressão significativa elevada, todavia a variância foi presente quando comparado os grupos, exibindo proteínas menos expressas do grupo 1 em relação ao G2, o qual foi identificada a proteína n ° X6RAH8 e P15516 como as proteínas menos expressas do grupo 1 em relação ao G2.

Em função disso, há necessidade de investigação para averiguar se a subexpressão dessas proteínas resulta da interferência da alta concentração de F nestes indivíduos. Este fato pode alterar a função molecular, componente celular ou processos biológicos dos indivíduos expostos.

A saliva tem sido amplamente utilizada como ferramenta no diagnóstico de inúmeras doenças, uma vez que a sua obtenção é fácil e realizada por um processo não invasivo, seu conteúdo é abundante e permite a obtenção de inúmeras moléculas relacionadas aos processos fisiológicos e a várias doenças que acometem os indivíduos.

Siqueira et al. (2008), a partir da secreção das glândulas salivares, identificou 56 proteínas através da glândula salivar menor, e evidenciou que esta, em contraste com as glândulas parótida e secreções submandibular / sublingual, apresenta conteúdo reduzido.



Nestas últimas glândulas, é possível identificar mais de mil proteínas através das abordagens proteômicas. Assim, os resultados com valores baixos desta pesquisa, em meio ao substrato analisado confirma, de fato o que cita o referido autor.

Neste trabalho, foi utilizado um tampão de lise de solubilização aplicado diretamente sobre as amostras, e este pode não ter sido o suficiente para remover os interferentes ou contaminantes (DNA, RNA, íons metálicos e principalmente sais iônicos) da saliva, haja vista que a eficácia da solubilização da proteína, depende do método de dissolução, da escolha dos detergentes e a composição da solução da amostra (KOBAYASHI et. al, 2011). A preparação da amostra é a parte mais crítica de qualquer experimento, este passo pode envolver homogeneização e lise celular (GALDOS, 2009), dessa maneira ao longo da metodologia, sobretudo no que se refere ao transporte do material biológico, possa ter ocorrido alteração da amostra, considerando a sensibilidade da técnica, para extração e separação da proteína, para a análise proteômica.

Mediante o exposto, como neste estudo apenas (18%) compreendeu saliva advinda da secreção da glândula parótida, esta com a característica de apresentar-se livre de bactérias ou substâncias exógenas, e que deve ser de primeira escolha, ocasionou a ausência de proteínas expressas ou super expressas na saliva.

O presente estudo é provavelmente o primeiro a explorar *in vivo* análise proteômica para fluorose óssea no solo brasileiro. Em estudos anteriores foi demonstrado *in vitro* (KOBAYASHI et al.,2011; CARVALHO et al., 2007; LEITE, 2007) que animais submetidos a elevadas doses de flúor ocorre alteração. A exposição ao F conduziu a certas modificações na expressão de proteínas, apontam nos seus estudos que o F tem como alvo os mecanismos moleculares dos osteoblastos e os osteoclastos. O efeito deletério do flúor sobre as células depende da concentração (micromolar a milimolar), duração da exposição, e do tipo de célula envolvida (indiferenciadas ou diferenciadas) (EVERETT, 2011).

Considerando o contexto de interação enzimática, o fluoreto inibe a secreção e/ou síntese de proteínas e influencia distintas vias de sinalização envolvidas na proliferação e apoptose. Porém, há algumas controvérsias quanto ao efeito dependendo da sua concentração (EVERETT, 2011).

Estudos nesse ramo buscam identificar e caracterizar as variações moleculares e aponta as populações susceptíveis aos efeitos indesejáveis ou potencialmente negativos desse íon, além de esclarecer os mecanismos fundamentais pelos quais o fluoreto age no organismo humano (EVERETT, 2011).



4. CONCLUSÃO

Devido ao número baixo de amostras de saliva advindas da glândula parótida, decorrente da hipossalivação em idosos e, sobretudo, ao transporte do material biológico, o tampão de lise pode não ter sido o suficiente para remover os interferentes ou contaminantes das amostras, e a alteração destas pode ter ocorrido, considerando a sensibilidade da técnica de análise proteômica, para extração e separação da proteína, ocasionando a quase ausência de proteínas expressas ou super expressas na saliva.

Embora algumas destas proteínas identificadas, tenham funções biológicas identificadas e distintas em outras partes do corpo humano, as suas funções na fluorose óssea, ainda não são conhecidas, o que necessita ser investigado.

Espera-se, que com a identificação dessas proteínas envolvidas nos processos metabólicos do flúor, possamos elucidar o metabolismo desse íon bem como identificar indivíduos mais vulneráveis à fluorose óssea.

Este trabalho representa um passo inicial de estudo molecular e celular com investigação proteômica de indivíduos portadores de fluorose óssea, e poderá fornecer um conjunto de ferramentas potente, para identificar potenciais candidatos a biomarcadores de susceptibilidade a FO, notadamente moléculas ou proteínas relacionadas com o modelamento ósseo.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRASIL. Fundação Nacional de Saúde. **Manual de fluoretação da água para consumo humano** / Fundação Nacional de Saúde. – Brasília : Funasa, 2012. 72 p.

CARVALHO, P. C.; FISCHER, J. S. G.; DEGRAVE, W. M.; CARVALHO, M. G. C., Marcadores séricos e espectrometria de massa no diagnóstico do câncer. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, vol. 42, n. 6, p. 431 -436, 2006.

CARVALHO, T. S.; KEHRLE, H. M.; SAMPAIO, F. C. Prevalence and severity of dental fluorosis among students from João Pessoa, PB, Brazil. **Brazilian Oral Research**, São Paulo, v. 21, n. 3, p.198-203, 13 abr. 2007.

EVERETT, E.T. Fluoride's Effects on the Formation of Teeth and Bones, and the Influence of Genetics. **Journal of Dental Research**, v. 90, n. 5, p. 552-560, Mai. 2011.

FAN, B., YU, Y., & ZHANG, Y. PI3K-Akt1 expression and its significance in liver tissues with chronic fluorosis. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, vol. 8, n. 2, p. 1226–1236. 2015.



GALDOS, A. C. R. **Análise proteômica do saco vitelino de bovinos**. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. 110f. Universidade de São Paulo, 2009.

KAAKE, R. M.; WANG, X.; HUANG, L., Profiling of Protein Interaction Networks of Protein Complexes Using Affinity Purification and Quantitative Mass Spectrometry. *Molecular Cellular Proteomics*, v. 9, n. 8, p. 1650-1665, 2010.

KHURDI, M. S. Chronic fluorosis: The disease and its anaesthetic implications. **Indian Journal of Anaesthesia**, vol. 60, n. 3, 2016.

KOBAYASHI C. A. N., BELINI, M. R., ITALIANI, F. M., PAULETO, A. R. C., JULIANELLI DE ARAÚJO, J., TESSAROLLI, V., GRIZZO, L. T., PESSAN, J. P., MACHADO, M. A. A. M., BUZALAF, M. A. R. Factors influencing fluoride ingestion from dentifrice by children. **Community Dental Oral Epidemiology**, v. 39: p. 426–432, 2011.

LAKATOS, Eva Maria Marina de, MARCONI, Maria de Andrade. *Metodologia Científica*. 5ª Ed. 3. Reimpr. São Paulo: Atlas, 2009. 312 p

LEITE, AF. **Correlação entre os índices radiomorfométricos de radiografias panorâmicas e a densidade mineral óssea em mulheres na pós-menopausa**. 2007. 144 f. Dissertação (Mestrado). Programa de pós-graduação em Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, UnB. Brasília, 2007.

LIMA JUNIOR, J. F. **Avaliação de sistemas de desfluoretação de águas para comunidades rurais do semi-árido**. Programa de Pós-graduação em Biotecnologia – UFPB (Doutorado). João Pessoa, 2012.

METZ, T. O.; BAKER, E. S.; SCHYMANSKI, E. L.; RENSLOW, R. S.; THOMAS, D. G.; WEBB, I. K.; HANN, S.; SMITH, R. D.; TEEGUARDEN, J. G., Integrating ion mobility spectrometry into mass spectrometry-based exposome measurements: what can it add and how far can it go? **Bioanalysis**., v. 9, n. 1, p. 81-98. 2017.

SIQUEIRA, W.L.; ZHANG, W.; HELMERHORST, E. J.; GYGI, S.P.; OPPENHEIM, F. G. Identification of protein components in in vivo human acquired enamel pellicle using LC - ESI – MS/MS. **Journal Proteome Res**. v. 6, n. 6, p. 2152 -2160, 2007.



SOARES, A. J. C.; SANTOS, M. F.; CHUNG, J.; DAVID, C. M. N.; DOMONT, G. B.,
Proteomica e sepse. Novas perspectivas para o diagnóstico. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, vol. 9, n. 1, São Paulo, 2007.

WAUGH, D.T.; POTTER, W.; LIMEBACK, H.; GODFREY, M. Risk Assessment of Fluoride Intake from Tea in the Republic of Ireland and its Implications for Public Health and Water Fluoridation. **International Journal of Environmental Research and Public Health**. Suíça. 13, 259, 2016.

WEY, Y.; ZENG, B.; ZHANG, H.; CHEN, C.; WU, Y.; WANG, N.; WU, Y.; SHEN, L.
iTRAQ-Based Proteomics Analysis of Serum Proteins in Wistar Rats Treated with Sodium Fluoride: Insight into the Potential Mechanism and Candidate Biomarkers of Fluorosis. **International Journal of Molecular Sciences**, 17, 1644, 2016.

World Health Organization (WHO). Fluoride in Drinking-water by J. Fawell, K. Bailey, J. Chilton, E. Dahi, L. Fewtrell and Y. Magara. London, UK, 2006.

