



**Armando José Cerejo
Caseiro**

Proteómica das glândulas salivares de ratinho



Armando José Cerejo Caseiro **Proteómica das glândulas salivares de ratinho**

dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Métodos Biomoleculares Avançados, realizada sob a orientação científica do Dr. Francisco Manuel Lemos Amado, Professor auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

o júri

presidente

Prof. Dr. Artur Manuel Soares da Silva

professor catedrático do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Prof. Dr.^a Maria Helena Raposo Fernandes

professora catedrática da Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto

Prof. Dr. Francisco Manuel Lemos Amado

professor auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

agradecimentos

Quero expressar um agradecimento especial ao meu orientador, Doutor Francisco Amado, pelo apoio, orientação e ensinamentos que permitiram o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Doutor Rui Vitorino pelo acompanhamento e apoio no laboratório.

À colaboração do Professor Doutor José Ramos Duarte e do Doutor José António Calado.

Aos Doutor Pedro Domingues e Doutora Rosário Domingues, pelo apoio e ânimo.

Aos colegas do laboratório de espectrometria de massa, Ana, Catarina, Cristina, Miguel, Rita, São, Sofia, Virginia, pelo apoio, incentivo e boa disposição.

Aos colegas do laboratório de patologia clínica, serviço de sangue e anatomia patológica do Hospital de Santo André - Leiria, pelo apoio, compreensão e incentivos ao longo desta jornada.

Aos meus familiares e amigos, que desde sempre me incentivaram a alcançar este objectivo

Aos meus pais e irmã, pelo apoio incondicional ao longo desta jornada e da vida.

palavras-chave

Glândulas salivares de ratinho, Parótida, Submandibular, Electroforese bidimensional em gel de poliacrilamida, MALDI-TOF/TOF, Proteómica.

resumo

A saliva é uma mistura complexa de proteínas, glicoproteínas, enzimas, hormonas, minerais e desempenha funções fisiológicas importantes. A maior produção de proteínas da saliva ocorre nas glândulas salivares, parótida, submandibular e sublingual e outras pequenas glândulas da mucosa oral.

Apesar das glândulas salivares apresentarem fulcral importância para a compreensão de determinadas patologias orais, o conhecimento da sua expressão proteica é ainda reduzido. Assim, o objectivo principal deste trabalho é a caracterização do proteoma das glândulas salivares, usando o ratinho como o modelo animal.

A caracterização do proteoma glandular envolveu o fraccionamento subcelular das glândulas parótida e submandibular, obtendo-se para cada uma delas, as fracções nuclear, citoplasmática e a correspondente aos grânulos secretores. Complementarmente foram isoladas células acinares das glândulas, procedendo-se ao seu fracionamento com obtenção da fracção citoplasmática. A análise das diferentes fracções efectuou-se utilizando electroforese bidimensional e cromatografia líquida de alta resolução para a separação de proteínas e péptidos e a digestão trípica para posterior identificação por espectrometria de massa.

Após a análise comparativa dos mapas 2DE das glândulas parótida e submandibular observaram-se perfis característicos distintos. Dos mapas 2DE obtidos para as diferentes fracções de parótida e submandibular foram identificadas, respectivamente, um total de 125 e 100 proteínas, sendo 33 das quais comuns. Da análise dos digestos trípticos dos grânulos indentificaram-se na parótida 52 péptidos pertencentes a 17 proteínas e na submandibular 255 péptidos pertencentes a 19 proteínas.

As diferentes proteínas identificadas pertenciam as diversas classes funcionais, destacando-se a classe proteolítica. Ambas as glândulas apresentaram uma grande variedade de caliceínas, principalmente a glândula submandibular onde se identificaram 15 membros desta família.

Este trabalho apresenta uma abordagem generalista da composição proteica das diferentes fracções das glândulas salivares de ratinho, facilitando o desenvolvimento futuro de investigações mais específicas e/ou relacionadas com uma patologia específica.

keywords

Mouse salivary glands, Parotid, Submandibular, Two-dimensional gel electrophoresis, MALDI-TOF/TOF, Proteomics.

abstract

Saliva is a complex mixture of proteins, glycoproteins, enzymes and hormones that play important physiological functions. The main protein sources of saliva are the salivary glands; parotid, submandibular, sublingual and numerous small glands distributed on the oral mucosa.

The knowledge of salivary glands protein expression is scarce and important for the understanding of some oral pathologies. The aim of this work is the characterization of the mouse salivary glands proteome, using the mouse as the animal model.

For the glandular proteome characterisation subcellular fractionation of the parotid and submandibular glands was performed, getting for each gland the nuclear, cytoplasmic and secretory granules fractions. Complementarily, glandular acinar cells were isolated and fractionated and the cytoplasmic fraction characterised. The analysis of the different fractions were performed by the separation of proteins and peptides by two-dimension gel electrophoresis (2DE) and high resolution liquid chromatography (HPLC-MS) and tryptic digestion used to further mass spectrometry identification.

After the comparative analysis of mouse parotid and submandibular 2DE maps, we observed distinct profiles. From the 2DE maps obtained to the different fractions of parotid and submandibular were respectively identified a total of 125 and 100 proteins, being 33 of them commons. From the HPLC-MS data were identified 52 peptides belonging to 17 proteins in parotid and 255 peptides that belong to 19 proteins in submandibular gland.

The different proteins identified belong to several functional classes, namely the proteolytic ones. In the submandibular gland about 32% of the identified proteins were from kallikreins family. The salivary glands express a great variety of kallikreins, mainly the submandibular gland in which was identified 15 proteins of this family.

This work is a general approach to the protein composition of the different mouse salivary glands fractions, contributing to future research with clinical applications.

ÍNDICE

LISTAGEM DE FIGURAS	V
LISTAGEM DE TABELAS	IX
ABREVIATURAS	XI
1- INTRODUÇÃO	1
1.1- CARACTERIZAÇÃO ANÁTOMO-MORFOLÓGICA DAS GLÂNDULAS SALIVARES HUMANAS	3
1.1.1- <i>Glândulas parótidas</i>	6
1.1.2- <i>Glândulas submandibulares</i>	7
1.1.3- <i>Glândulas sublinguais</i>	10
1.1.4- <i>Pequenas glândulas salivares da cavidade oral</i>	10
1.2- COMPOSIÇÃO PROTEICA SALIVAR	11
1.3- MECANISMOS DE SECREÇÃO SALIVAR DE ÁGUA E ELECTRÓLITOS E SUA REGULAÇÃO	15
1.3.1- <i>Modelo de secreção de fluido e electrólitos dependente de Cl⁻</i>	16
1.3.2- <i>Modelo de secreção de fluido e electrólitos dependente de HCO₃⁻</i>	18
1.4- MECANISMOS DE SECREÇÃO PROTEICA DAS CÉLULAS ACINARES E SUA REGULAÇÃO	20
1.4.1- <i>Vias de secreção nas células acinares da parótida</i>	24
1.4.1.1- <i>Secreção regulada</i>	25
1.4.1.2- <i>Secreção constitutiva</i>	25
1.4.1.3- <i>Transporte de imunoglobulina A</i>	26
1.5- CARACTERIZAÇÃO DOS GRÂNULOS SECRETORES	27
1.5.1- <i>Biogénese dos grânulos secretores</i>	28
1.5.1.1- <i>Mecanismos de selecção e armazenamento de proteínas nos grânulos</i>	30
1.5.1.2- <i>Retenção de proteínas nos grânulos secretores</i>	32
1.5.1.3- <i>Mecanismos de exocitose dos grânulos secretores</i>	34
1.6- METODOLOGIA APLICADA NA IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS	38
1.6.1- <i>Técnicas separativas</i>	38
1.6.1.1- <i>Electroforese de uma dimensão em gel de poliacrilamida (1DE)</i>	38
1.6.1.2- <i>Electroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (2DE)</i>	39
1.6.1.3- <i>Cromatografia líquida (LC)</i>	40

1.6.1.4- Chips de proteínas /SELDI	40
1.6.2- Identificação de proteínas	41
1.7- OBJECTIVOS	43
2- PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	45
2.1- MATERIAL	47
2.1.1- Reagentes	47
2.1.2- Equipamentos.....	47
2.1.3- Material Biológico	48
2.2- MÉTODOS	49
2.2.1- Separação das fracções nuclear e citoplasmática das glândulas salivares.....	49
2.2.2- Protocolo de isolamento de células acinares das glândulas salivares de ratinho.....	49
2.2.3- Extracção da fracção citoplasmática das células acinares	50
2.2.4- Isolamento dos grânulos secretores das glândulas salivares.....	50
2.2.5- Remoção de interferentes à execução de 2DE presentes nas amostras	51
2.2.6- Quantificação da proteína presente nas amostras.....	52
2.2.7- Electroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (2DE).....	52
2.2.8- Revelação dos géis de 2-DE.....	53
2.2.8.1- Revelação com prata reversível	53
2.2.8.2- Revelação com coomassie coloidal.....	54
2.2.9- Análise dos dados de 2DE.....	54
2.2.10- Nano-HPLC de digestos tripticos de péptidos	54
2.2.11- Identificação de proteínas.....	55
2.2.11.1- Digestão das proteínas com tripsina.....	55
2.2.11.2- Espectrometria de massa.....	56
2.2.11.3- Pesquisa nas bases de dados.....	56
3- RESULTADOS	57
3.1- FRACCIONAMENTO DA GLÂNDULA PARÓTIDA.....	59
3.1.1- Fracção citoplasmática.....	59
3.1.2- Fracção nuclear.....	60

3.1.3- Células acinares de parótida.....	61
3.1.4- Grânulos secretores de parótida	63
3.2- FRACCIONAMENTO DA GLÂNDULA SUBMANDIBULAR.....	66
3.2.1- Fracção citoplasmática	66
3.2.2- Fracção nuclear	67
3.2.3- Células acinares de submandibular	68
3.2.4- Grânulos secretores de submandibular.....	70
3.3- GLÂNDULA PARÓTIDA VERSUS GLÂNDULA SUBMANDIBULAR	73
4- DISCUSSÃO.....	79
5- CONCLUSÃO	87
6- BIBLIOGRAFIA.....	91
7- ANEXOS	103

LISTAGEM DE FIGURAS

Figura 1: Localização anatômica das principais glândulas salivares na cavidade oral; 1-Parótida, 2-Submandibular, 3- Sublingual (adaptado de Aps & Martens, 2005).	3
Figura 2:Esquema representativo da unidade básica da glândula salivar (adaptado de Regezi, 1989).	4
Figura 3: Fotografia de células acinares das glândulas salivares humanas, por microscopia electrónica de varrimento; A- glândula parótida, B- glândula submandibular, blm- membrana basolateral, sg- grânulos secretores, n- núcleo (adaptado de Segawa <i>et al.</i> , 1998).....	5
Figura 4: Dissecção da região parotídea (adaptado de Moore, 1992).....	6
Figura 5: Preparação de glândula parótida, visualizada por microscopia óptica (MO), onde se observam ácinos serosos (S) e ductos secretores (SD) (adaptado de Wheater <i>et al.</i> , 1979).....	7
Figura 6: Preparação de glândula submandibular, visualizada por MO (x 128), corada pela Hematoxilina-Eosina (HE) e contrastada com Azul Alcian para evidenciar as células secretoras mucosas; A- adipócito, D- “Serous demilunes”, E- ducto excretor, I- ductos intercalares, S- ducto estriado (adaptado de Wheater <i>et al.</i> , 1979).....	9
Figura 7: Fotografia de preparação de glândula submandibular, visualizada por MO (x 320), corada pela HE e representação esquemática de uma unidade secretora mista, onde se observam vários ácinos mucosos (M) associados a “serous demilunes” (S) (adaptado de Wheater <i>et al.</i> , 1979).....	9
Figura 8: Esquema do modelo de secreção de fluido e electrólitos dependente de Cl ⁻ (adaptado de Melvin <i>et al.</i> , 2005).....	18
Figura 9: Esquema do modelo de secreção de fluido e electrólitos dependente de HCO ₃ ⁻ (adaptado de Melvin <i>et al.</i> , 2005).....	19
Figura 10: Representação esquemática das vias de transdução de sinal da glândula parótida utilizadas na exocitose regulada dos seus grânulos secretores (adaptado de Ishikawa <i>et al.</i> , 2006).....	21
Figura 11: A- Processo de formação de grânulos secretores maduros, através da retenção de proteínas. Este processo sofre influência do pH. Neste processo são importantes as proteoglicanas sulfatadas (proteoglicanas ácidas) no armazenamento de proteínas-ricas em prolina ácidas. O tratamento destas células com bases fracas, interfere com a retenção das proteínas nos grânulos secretores. Alterações nas	

quantidades relativas de proteínas ácidas e básicas podem afectar o armazenamento nos grânulos secretores. B- As vesículas desta via de secreção resultam da maturação dos grânulos secretores imaturos. C- As vesículas desta via de secreção resultam da maturação dos grânulos secretores imaturos e apresentam uma baixa quantidade de proteína secretora da parótida (adaptado de Gorr <i>et al.</i> , 2005).....	24
Figura 12: Fotografia de grânulos secretores da parótida por microscopia electrónica de transmissão (adaptado de Dohke <i>et al.</i> , 1998).....	27
Figura 13: Esquema representativo da hipótese de <i>sorting for entry</i> (adaptado de Tooze, 1998).....	31
Figura 14: Esquema representativo da hipótese de <i>sorting by retention</i> (adaptado de Tooze, 1998).	32
Figura 15: Representação esquemática do processo de exocitose por <i>kiss and run</i> e por fusão completa (adaptado de Burgoyne & Morgan, 2003).....	35
Figura 16: Esquema representativo das principais proteínas envolvidas no processo de exocitose dos grânulos secretores (adaptado de Burgoyne & Morgan, 2003).	37
Figura 17: Esquema representativo das diferentes modalidades utilizadas na separação de proteínas de misturas complexas, 1DE, 2DE, LC e SELDI, seguida da sua indentificação por MS e MS/MS (adaptado de Lim & Elenitoba-Johnson, 2004).	38
Figura 18: Gel de 2DE da fracção citoplasmática de parótida revelado com prata.	59
Figura 19: Distribuição das proteínas identificadas na fracção citoplasmática de parótida segundo a sua função.	60
Figura 20: Distribuição das proteínas identificadas na fracção nuclear de parótida segundo a sua função.	61
Figura 21: Fotografia de microscopia óptica das células acinares de parótida (x 400).	62
Figura 22: Distribuição das proteínas identificadas na fracção citoplasmática das células acinares de parótida segundo a sua função.	62
Figura 23: Fotografia de microscopia electrónica de transmissão de uma fracção enriquecida de grânulos secretores de parótida.	63
Figura 24: Distribuição das proteínas identificadas nos grânulos secretores de parótida segundo a sua função.	64
Figura 25: Gel 2DE da fracção citoplasmática de submandibular revelado com prata.	66

Figura 26: Distribuição das proteínas identificadas na fracção citoplasmática de submandibular segundo a sua função.	67
Figura 27: Distribuição das proteínas identificadas na fracção nuclear de submandibular segundo a sua função.	68
Figura 28: Fotografia de microscopia óptica das células acinares de submandibular (x 400).....	69
Figura 29: Distribuição das proteínas identificadas na fracção citoplasmática das células acinares de submandibular segundo a sua função.....	70
Figura 30: Fotografia de microscopia electrónica de transmissão da fracção enriquecida de grânulos secretores de submandibular.....	70
Figura 31: Distribuição das proteínas identificadas nos grânulos secretores de submandibular segundo a sua função.	71
Figura 32: Número de caliceínas diferentes identificadas nas fracções das glândulas parótida e submandibular por 2DE-MALDI-TOF/TOF e nano-HPLC-MALDI-TOF/TOF.....	75
Figura 33: Distribuição quantitativa das diferentes caliceínas identificadas nas fracções da glândula submandibular.....	76

LISTAGEM DE TABELAS

Tabela 1: Conjunto de proteínas identificadas em saliva total, saliva produzida pelas glândulas parótidas e pelas glândulas submandibulares/sublinguais (adaptado de Walz <i>et al.</i> , 2006).....	14
Tabela 2: Componentes da solução A	49
Tabela 3: Proteínas e número de péptidos identificados nos digestos trípticos de péptidos dos grânulos secretores de parótida.....	65
Tabela 4: Proteínas e número de péptidos identificados nos digestos trípticos dos grânulos secretores de submandibular.....	72

ABREVIATURAS

1DE	Electroforese de uma dimensão em gel de poliacrilamida
2DE	Electroforese bidimensional em gel de poliacrilamida
AC	Adenilciclase
ACN	Acetonitrilo
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
BSA	Albumina de soro bovino
DAG	Diacilglicerol
Da	Dalton
DNA	Ácido desoxiribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiaminotetraacético
EGF	Factor de crescimento epidérmico
EGTA	Ácido glicoetildiaminotetraacético
ESI	Ionização por electrospray
GDP	Guanosina difosfato
GSI	Grânulos secretores imaturos
GSM	Grânulos secretores maduros
GTP	Guanosina trifosfato
HE	Hematoxilina-eosina
HPLC	Cromatografia líquida de alta pressão
IEF	Focagem isoeléctrica
IgA	Imunoglobulina A
IP3	Inositol tri-fosfato
LC	Cromatografia líquida
MALDI	Ionização por desorção por laser assistida pela matriz
MDLC	Cromatografia líquida multidimensional
ME	Microscopia electrónica.
MO	Microscopia óptica.
MS	Espectrometria de massa
MS/MS	Espectrometria de massa tandem

MW	Peso molecular
NGF	Factor de crescimento nervoso
nNOS	Óxido nítrico sintetase neuronal
NSF	<i>N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein</i>
PAGE	Electroforese em gel de poliacrilamida
PARs	Receptores activados por proteases
PiGR	<i>Poly immunoglobulin Receptor</i>
PKA	Fosfocinase A
PKC	Fosfocinase C
PLCβ	Fosfolipase C β
PMF	<i>Peptide mass fingerprint</i>
PRPs	Proteínas-ricas em prolina
PSP	Proteína secretora da parótida
RNA	Ácido ribonucleico
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Dodecil sulfato de sódio- electroforese em gel de poliacrilamida
SELDI	<i>Surface-enhanced laser desorption/ionisation</i>
SNAP	<i>Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein</i>
SNAREs	<i>Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor</i>
TA	Temperatura ambiente
TFA	Ácido trifluoracético
TGN	Rede trans do Golgi
TOF	Tempo-de-voo
VAMP	<i>Vesicle associated membrane protein</i>
VIP	Péptido intestinal vasoactivo
VC	Vacúolos de condensação

1- INTRODUÇÃO

1.1- Caracterização anátomo-morfológica das glândulas salivares humanas

Existem três pares principais de glândulas salivares: parótidas, submandibulares, sublinguais e numerosas pequenas glândulas distribuídas pela língua, palato, mucosa bucal e mucosa labial. No seu conjunto as glândulas salivares produzem diariamente cerca de 800 a 1500 mL de saliva. Estas glândulas produzem um alto volume de saliva em relação ao tamanho: a quantidade máxima é de aproximadamente 1 mL/min/g de tecido glandular (Ellis *et al.*, 1991; Moore, 1992; Melvin *et al.*, 2005; Aps & Martens, 2005).

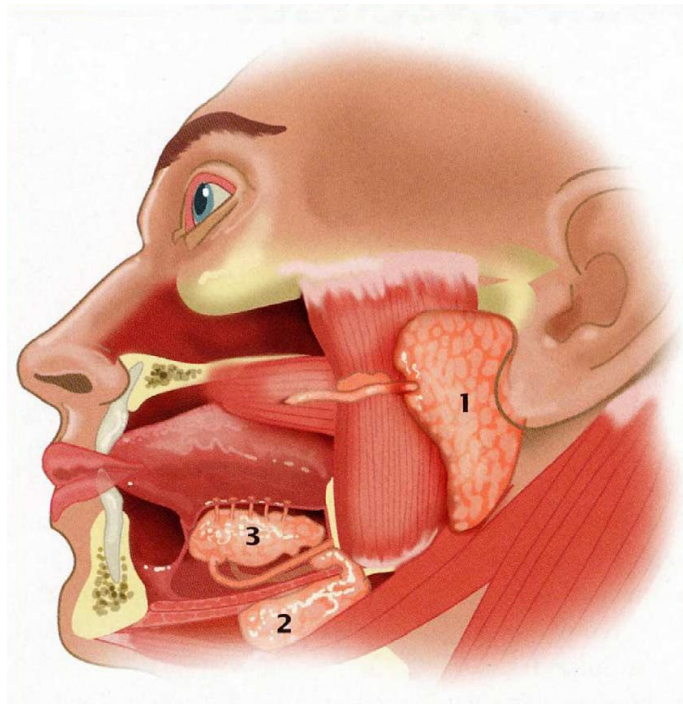


Figura 1: Localização anatómica das principais glândulas salivares na cavidade oral; 1-Parótida, 2-Submandibular, 3- Sublingual (adaptado de Aps & Martens, 2005).

As glândulas salivares apresentam a forma de uma estrutura ramificada, com estruturas secretoras terminais, os ácidos. O ducto secretor principal da glândula divide-se em ductos estriados progressivamente mais pequenos. Por sua vez os ductos estriados ramificam-se em pequenos ductos intercalares que terminam nos ácidos. Os ductos intercalares, constituídos por epitélio simples cúbico, iniciam o transporte dos produtos de

secreção, continuando pelos ductos estriados constituídos por epitélio simples colunar e passando finalmente pelo ducto excretor, constituído por epitélio estratificado escamoso até chegar à cavidade oral (Ellis *et al.*, 1991).

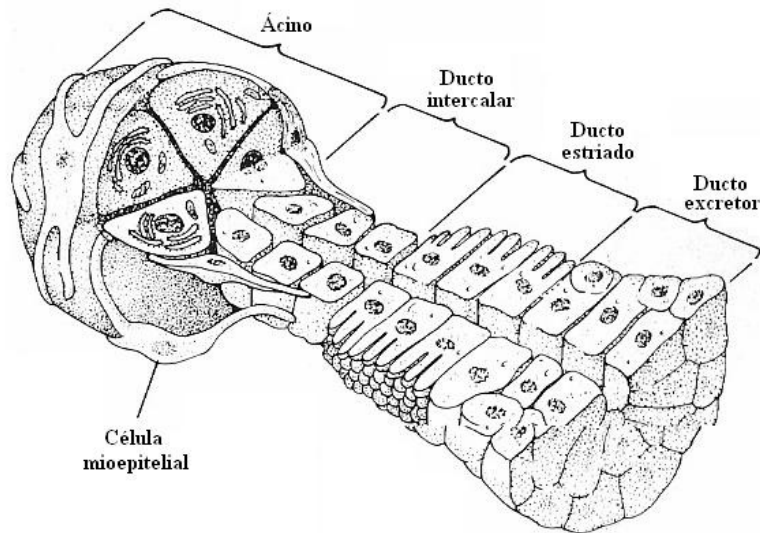


Figura 2:Esquema representativo da unidade básica da glândula salivar (adaptado de Regezi, 1989).

Os ácinos variam consideravelmente de forma, tamanho e número de células. Geralmente as glândulas mucosas apresentam ácinos terminais de forma tubular, enquanto que os das glândulas serosas apresentam uma forma esférica. Os principais tipos de células acinares são as células mucosas e as células serosas. A distribuição destas células difere consoante a glândula salivar. As células acinares das glândulas salivares compreendem quase 90% da glândula e sintetizam e segregam quase todas as proteínas salivares (Wheater *et al.*, 1979; Ellis *et al.*, 1991).

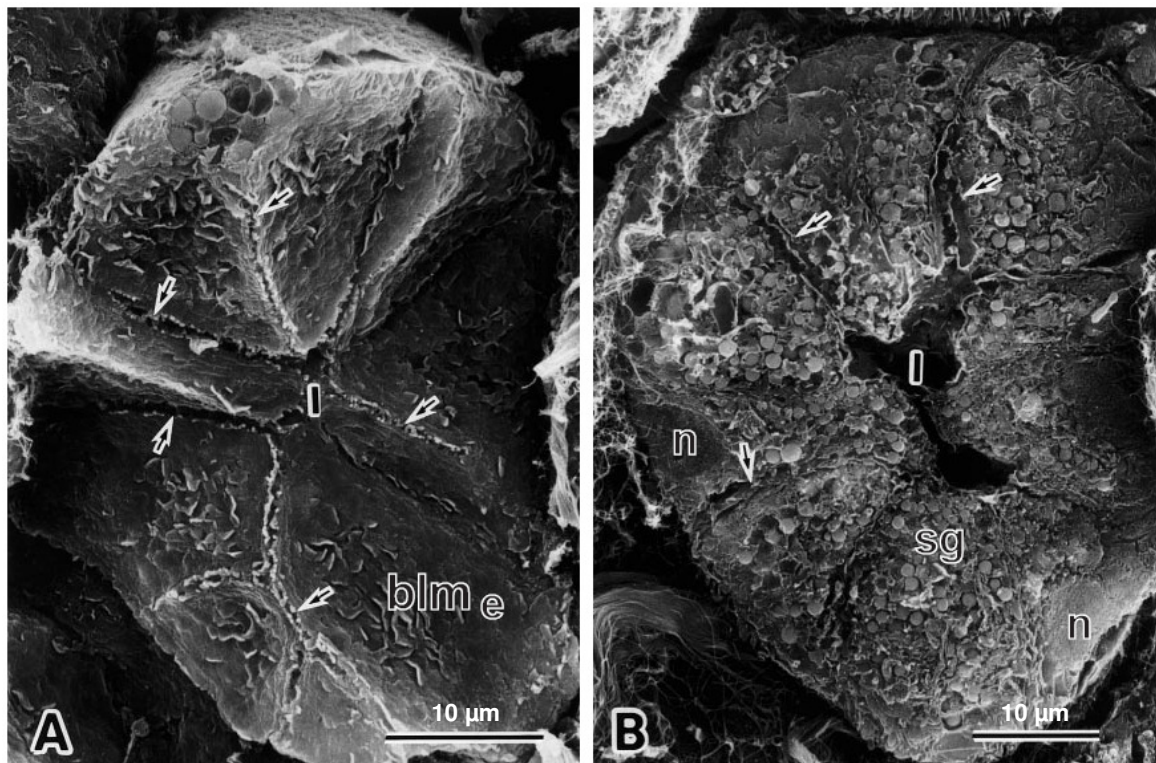


Figura 3: Fotografia de células acinares das glândulas salivares humanas, por microscopia electrónica de varrimento; A- glândula parótida, B- glândula submandibular, blm- membrana basolateral, sg- grânulos secretores, n- núcleo (adaptado de Segawa *et al.*, 1998).

As células serosas apresentam uma forma piramidal, encontrando-se o ápice estreito próximo do lúmen do ácino e o núcleo esférico na porção basal da célula. Ao nível ultra-estrutural, encontra-se um extenso retículo endoplasmático rugoso na zona basal e lateral ao núcleo. O complexo de Golgi situa-se numa zona lateral ou apical ao núcleo. Nestas células encontram-se na zona apical do citoplasma os grânulos secretores. Estas células apresentam vilosidades na sua membrana apical (Ellis *et al.*, 1991).

As células mucosas ao microscópio óptico apresentam uma forma piramidal, com um núcleo basal achatado e normalmente são maiores que as células serosas. Ao nível ultra-estrutural as células mucosas apresentam um complexo de Golgi proeminente, situado numa zona lateral ao núcleo ou entre o núcleo e a zona apical onde se encontram os produtos sintetizados. O retículo endoplasmático, mitocôndrias e outros organelos estão normalmente confinados à zona basal ou lateral da célula (Ellis *et al.*, 1991).

1.1.1- Glândulas parótidas

As glândulas parótidas são as maiores das glândulas salivares, localizando-se próximo do pavilhão auditivo externo, mais precisamente entre o ramo da mandíbula e a mastóide. A glândula desenvolve-se a partir da boca primitiva e apresenta-se no ser humano como uma massa amarelada, lobulada e irregular. A sua forma irregular deve-se ao facto do seu crescimento se efectuar entre a mandíbula e a mastóide, no interior da fáscia cervical. Ao longo do seu desenvolvimento a parótida envolve estruturas desta área, nomeadamente o nervo facial. Esta glândula apresenta um ducto que a atravessa horizontalmente a partir do seu bordo anterior, designando-se de ducto parotídeo ou canal de Stensen, que desemboca na cavidade oral ao nível da coroa do segundo dente molar superior (Ellis *et al.*, 1991; Moore, 1992).

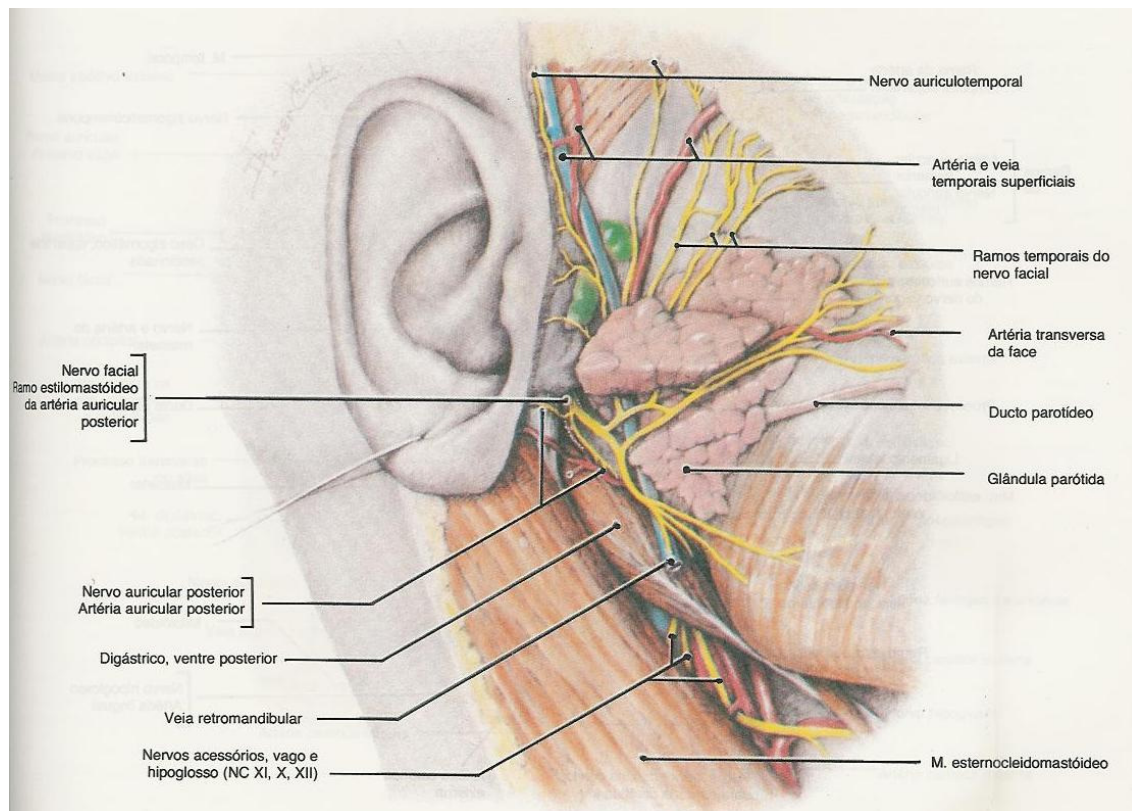


Figura 4: Dissecção da região parotídea (adaptado de Moore, 1992).

A irrigação e drenagem da glândula parótida fazem-se através da artéria carótida externa e dos seus ramos terminais, a artéria temporal superficial e a artéria maxilar e de

veias da glândula parótida que drenam para a veia retro-mandibular, que por sua vez desemboca na veia jugular externa (Moore, 1992).

Relativamente à drenagem linfática da parótida, os vasos linfáticos desta glândula terminam nos nódulos linfáticos cervicais superficial e profundo, podendo existir dois ou três nódulos linfáticos à superfície da glândula e também no seu interior (Moore, 1992).

A parótida é inervada por componentes do sistema nervoso simpático e parassimpático. A inervação parassimpática da glândula parótida faz-se pelos nervos auricular magno e auriculotemporal, provenientes do gânglio óptico do nervo glossofaríngeo. Relativamente à inervação simpática, esta efectua-se por fibras derivadas dos gânglios cervicais, através de um plexo de fibras nervosas simpáticas na artéria carótida externa - plexo carotídeo externo (Moore, 1992).

A glândula parótida é uma glândula serosa, apresentando ácidos serosos de forma esférica constituídos por células serosas (Wheater *et al.*, 1979; Ellis *et al.*, 1991).

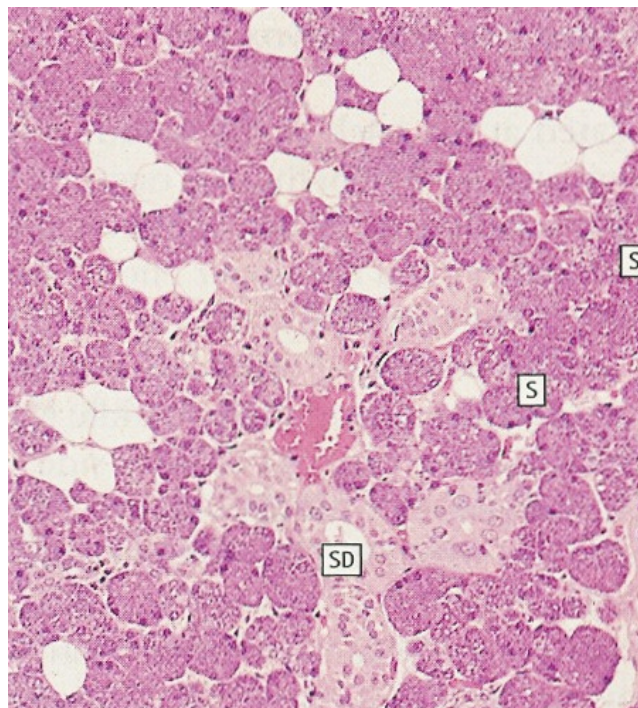


Figura 5: Preparação de glândula parótida, visualizada por microscopia óptica (MO), onde se observam ácidos serosos (S) e ductos secretores (SD) (adaptado de Wheeler *et al.*, 1979).

1.1.2- Glândulas submandibulares

As glândulas submandibulares localizam-se ao longo do corpo da mandíbula e apresentam-se sob a forma de U. Estas glândulas têm uma porção que se situa acima e outra abaixo da metade posterior da base da mandíbula e um tamanho aproximado ao de um polegar. A glândula pode palpar-se como uma massa amolecida sobre a porção posterior do músculo miloióideo quando é tensionado. Apresenta um ducto principal, designado de ducto submandibular ou ducto de Wharton, que tem origem na porção da glândula que se situa entre os músculos hipoglosso e miloióideo. Este ducto passa profundamente e depois superficialmente ao nervo lingual e abre-se através de 1 a 3 orifícios numa pequena papila sublingual localizada ao lado do freio da língua (Moore, 1992).

Os nódulos linfáticos submandibulares encontram-se parcialmente encravados entre a glândula e a mandíbula. A irrigação desta glândula é da responsabilidade do ramo submental da artéria facial (Moore, 1992).

No que respeita à inervação, esta é suprida por fibras parassimpáticas do gânglio submandibular, derivadas dos nervos lingual e corda do tímpano e por nervos simpáticos derivados do gânglio cervical superior (Moore, 1992; Ishikawa *et al.*, 2006).

A glândula submandibular é uma glândula mista, apresentando ácinos constituídos por células serosas e células mucosas. Cerca de 80% da glândula é constituída por ácinos serosos, sendo os restantes 20% ocupados por ácinos mucosos, revestidos na extremidade por células serosas designadas *serous demilunes* (Wheater *et al.*, 1979; Ellis *et al.*, 1991).

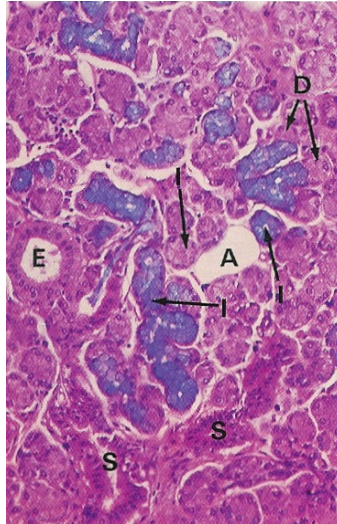


Figura 6: Preparação de glândula submandibular, visualizada por MO (x 128), corada pela Hematoxilina-Eosina (HE) e contrastada com Azul Alcian para evidenciar as células secretoras mucosas; A- adipócito, D- “Serous demilunes”, E- ducto excretor, I- ductos intercalares, S- ducto estriado (adaptado de Wheater *et al.*, 1979).

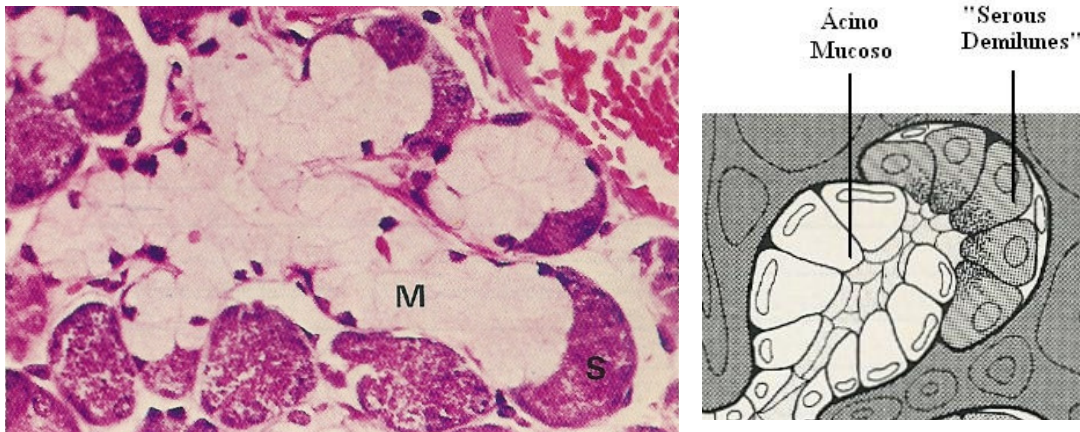


Figura 7: Fotografia de preparação de glândula submandibular, visualizada por MO (x 320), corada pela HE e representação esquemática de uma unidade secretora mista, onde se observam vários ácinos mucosos (M) associados a “serous demilunes” (S) (adaptado de Wheater *et al.*, 1979).

1.1.3- Glândulas sublinguais

As glândulas sublinguais localizam-se na base da cavidade oral, entre a mandíbula e o músculo genioglosso e apresentam uma forma estreita e alongada, assemelhando-se a uma amêndoa. Esta glândula apresenta 10 a 12 pequenos ductos que ajudam a transportar a saliva para a cavidade oral (Moore, 1992).

A glândula é irrigada pelos ramos das artérias lingual e facial, respectivamente pelas artérias sublingual e submental. A inervação parassimpática da glândula sublingual é a continuação da inervação da submandibular. A inervação simpática deriva do gânglio cervical superior (Moore, 1992).

As glândulas sublinguais são glândulas essencialmente mucosas, apresentando ácinos de forma tubular constituídos por células mucosas e algumas unidades secretoras mistas (Wheater *et al.*, 1979; Ellis *et al.*, 1991).

1.1.4- Pequenas glândulas salivares da cavidade oral

Existem ainda pequenas glândulas salivares distribuídas pela língua, palato, mucosa bucal e mucosa labial. Existem entre 500 e 1000 destas estruturas glandulares. Estas glândulas são pequenas glândulas mucosas, à exceção das glândulas serosas de Ebner, localizadas na língua (Ellis *et al.*, 1991; Moore, 1992).

1.2- Composição proteica salivar

A saliva é um fluido biológico importante que apresenta uma mistura complexa de glicoproteínas, proteínas, enzimas e hormonas, que desempenham funções fisiológicas importantes (Ghafouri *et al.*, 2003).

A saliva apresenta diversas funções especializadas como a iniciação da digestão, a defesa anti-microbiana, secreção de anticorpos, protecção contra agressões mecânicas e químicas e a hidratação das mucosas da cavidade oral, orofaringe e esófago. A importância da saliva demonstra-se claramente em indivíduos com xerostomia, que apresentam dor oral, aumento de cáries dentárias e infecção por microrganismos oportunistas (Gorr *et al.*, 2005; Aps & Martens, 2005; Melvin *et al.*, 2005).

A maior produção de proteínas da saliva ocorre nas glândulas salivares, parótida, submandibular e sublingual e outras pequenas glândulas da mucosa oral, contudo não podemos esquecer a contribuição do sangue, tecidos orais e microrganismos. As células acinares são responsáveis pela secreção da maioria das proteínas da saliva (>85%), no entanto, as células do ducto também secretam várias proteínas com importantes funções biológicas como factores de crescimento (NGF, EGF), imunoglobulina A e calicreínas. A composição proteica da saliva depende também do ritmo circadiano, idade, sexo, dieta e estado fisiológico do indivíduo (Battino *et al.*, 2002; Schipper *et al.*, 2006).

Relativamente ao conteúdo proteico da saliva, esta é constituída principalmente por glicoproteínas (ex.: mucinas, glicoproteínas-ricas em prolina), enzimas (ex.: amilase, anidrase carbónica) e uma grande variedade de péptidos (ex.: cistatinas, staterinas, histatinas, proteínas-ricas em prolina) (Vitorino *et al.*, 2004; Amado *et al.*, 2005; Dodds *et al.*, 2005).

A função biológica da maioria das proteínas da saliva continua por compreender, no entanto, a saliva apresenta uma variedade de proteínas, que se encontram unicamente neste fluido e que desempenham funções de particular importância para a saúde oral. Muitas destas proteínas contêm elevados níveis de prolina (35-40%), sendo designadas por proteínas-ricas em prolina (PRPs) (Dodds *et al.*, 2005; Vitorino *et al.*, 2005).

As PRPs, compreendem cerca de 70% do conteúdo proteico total da saliva produzida pela glândula parótida humana, encontrando-se agrupadas em três grupos de

acordo com a sua carga e grau de glicosilação: ácidas, básicas e básicas glicosiladas. As PRPs ácidas são proteínas multifuncionais, com domínios separados de ligação a bactérias e à hidroxiapatite e quando se encontram adsorvidas à superfície do dente, podem fornecer locais de ligação altamente específicos para determinadas bactérias presentes na cavidade oral (Vitorino *et al.*, 2005; Dodds *et al.*, 2005).

O restante conteúdo proteico da saliva produzida pela parótida é constituído na sua maioria por amilase, existindo no entanto outras proteínas como a lisozima, lactoferrina, peroxidase e IgA secretora, que apesar de se encontrarem em pequenas quantidades, estão relacionadas com a saúde oral. A lactoferrina em combinação com peroxidase compreendem um potente sistema inibidor de bactérias cariogénicas. A lactoferrina, uma proteína ligadora de ferro, tem a capacidade de captar iões ferro do ambiente oral necessários ao metabolismo bacteriano (Dodds *et al.*, 2005; Vitorino *et al.*, 2006).

Outra proteína presente na saliva é a staterina, que permite que a saliva mantenha o seu estado supersaturado, no que respeita a sais de fosfato e cálcio. As staterinas fornecem ainda locais de ligação ao dente e à mucosa oral a uma variedade de microorganismos orais. Estas proteínas contribuem para a manutenção de uma dentição intacta, inibindo a precipitação espontânea do fosfato de cálcio (Dodds *et al.*, 2005).

As mucinas, o maior componente orgânico da saliva submandibular e sublingual, são grandes glicoproteínas, constituindo dois grupos principais, o MG1 e o MG2. O grupo MG1 corresponde às mucinas de elevado peso molecular (10-30 MDa), codificado pelo gene *MUC5B* é agora designado por MUC5B. As mucinas de baixo peso molecular (~130 kDa), pertencem ao grupo MG2, produto de tradução do gene *MUC7*, agora designado de MUC7. O elevado grau de glicosilação e potencial de hidratação previne a desidratação e as suas propriedades viscoelásticas fornecem lubrificação. Estas glicoproteínas estão ainda envolvidas na ligação a toxinas, aglutinação de bactérias e são componentes importantes da película adquirida (Van Nieuw Amerongen *et al.*, 2004; Dodds *et al.*, 2005).

Outro grupo de interesse de proteínas da saliva são as histatinas. Estas pequenas proteínas (3-5 kDa), básicas e ricas em histidina, encontram-se quer na saliva produzida pela parótida quer pela submandibular/sublingual. Uma característica interessante destas proteínas é o facto de possuírem actividade anti-candida (Dodds *et al.*, 2005).

Estudos recentes da composição proteica salivar, recorrendo a técnicas de separação de proteínas como a electroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (2DE)

e a cromatografia líquida (LC), seguidas de identificação das proteínas por técnicas de espectrometria de massa (MS), têm contribuído para o conhecimento do proteoma salivar, encontrando-se já identificadas 1381 proteínas salivares (Vitorino *et al.*, 2004; Wilmarth *et al.*, 2004; Hardt *et al.*, 2005; Hu *et al.*, 2005; Xie *et al.*, 2005; Guo *et al.*, 2006; Walz *et al.*, 2006).

Cada tipo de glândula salivar segrega um espectro característico de proteínas para a saliva. A tabela seguinte apresenta um conjunto de proteínas identificadas por Walz *et al.* (2006), em saliva total, saliva produzida pela glândula parótida e pelas glândulas submandibular/sublinguais (SM/SL) respectivamente:

Nome da Proteína	Tipo de saliva		
	Saliva Total	Saliva da Parótida	Saliva da SM/SL
Actin	x		
Calgranulin A	x		
Calgranulin B	x		
Carbonic anhydrase VI	x	x	x
Chain B, D human Zn- α_2 -glycoprotein	x	x	x
Cyclophilin B	x		
Cystatin B	x		
Cystatin C	x		x
Cystatin D	x		
Cystatin SA-III precursor of acquired enamel pellicle	x		
Cystatin SA	x		x
Cystatin SN precursor	x	x	x
Cytokeratin 1	x		
Enolase 1	x		
Human salivary amylase	x	x	x
Ig alpha-1 chain C region	x		
Keratin 10	x		
Lactoferrin	x		
Parotid secretory protein	x		x
Phosphoglycerate kinase	x		
Poly-Ig-receptor	x	x	x
Prolactin-inducible protein	x		x
Proline-rich phosphoprotein (gene <i>PRH1</i> Db allele)	x	x	x
PRP <i>Bst</i> NI, subfamily 1, isoform 3	x	x	
PRP <i>Bst</i> NI, subfamily 3 (PRG)	x	x	
Prolyl-4-hydroxylase	x		
Serum albumin	x	x	x
Thioredoxin	x		
Transferrin	x		
HSPC059		x	
Ig alpha-2 heavy chain		x	
Ig κ light chain VLJ region		x	
Lactoperoxidase, salivary peroxidase		x	
Salivary acidic proline-rich phosphoprotein 1/2 precursor		x	
CST1			x
Cystatin S			x
Histatin 1			x
Mucin 7			x
0808206A peptide PA, proline-rich peptide			x

Tabela 1: Conjunto de proteínas identificadas em saliva total, saliva produzida pelas glândulas parótidas e pelas glândulas submandibulares/sublinguais (adaptado de Walz *et al.*, 2006).

1.3- Mecanismos de secreção salivar de água e electrólitos e sua regulação

A libertação dos componentes salivares pelas células acinares é regulada por estímulos neuronais. As células acinares são fortemente inervadas quer pelo sistema nervoso simpático quer pelo sistema nervoso parassimpático, sendo os neurotransmissores clássicos e alguns péptidos bioactivos os principais estímulos de secreção (Castle & Castle, 1998; Ishikawa *et al.*, 2006).

A activação dos receptores muscarínicos do tipo M3 das glândulas salivares, pela acetilcolina libertada pelos terminais dos nervos parassimpáticos, pela pilocarpina ou pela *cevimeline*, produz um aumento no fluxo de fluido salivar (Ishikawa *et al.*, 2006).

O efeito dos nervos parassimpáticos é predominante, sendo o estímulo principal para induzir o fluxo de saliva. Se a inervação parassimpática for interrompida as glândulas salivares atrofiam (Bedi, 1993; Mehansho & Carlson, 1983).

A norepinefrina libertada pelos terminais nervosos do sistema nervoso simpático actua em ambos os receptores adrenérgicos (α e β) nas glândulas parótida e submandibular. A activação dos receptores α -adrenérgicos provoca um modesto aumento na secreção de fluido salivar (Ishikawa *et al.*, 2006).

O desequilíbrio dos sistemas colinérgico e adrenérgico ou condições exógenas que podem induzir diferente estimulação, como medicação, radiação e ingestão de comida, entre outros, produzem alterações no fluxo salivar (Jensen & Barkvoll, 1998; Aps *et al.*, 2005).

Tal como a secreção de fluidos de outras glândulas exócrinas, a secreção de saliva pelas glândulas salivares é um processo que envolve duas etapas. O fluido inicialmente segregado pelas células acinares das glândulas salivares é um fluido isotónico, uma solução rica em NaCl, tipo plasma. As células acinares são indicadas como produtoras de todo o fluido presente na saliva. Na etapa seguinte este fluido passa através do sistema de ductos, onde o NaCl é reabsorvido, enquanto o K^+ e o HCO_3^- são excretados. A saliva segregada é um fluido hipotónico, indicando uma impermeabilidade relativa dos ductos à água. (Aps *et al.*, 2005; Melvin *et al.*, 2005).

1.3.1- Modelo de secreção de fluido e electrólitos dependente de Cl^-

O modelo do movimento transepitelial de iões cloreto (Cl^-), actualmente aceite como a força condutora primária para a secreção de líquidos e electrólitos pelas células acinares das glândulas salivares, baseia-se na elevação dos níveis intracelulares de Cl^- . As células acinares apresentam na sua membrana basolateral bombas Na^+/K^+ , que trocam 3 iões sódio (Na^+) intracelulares por 2 iões potássio (K^+) extracelulares, com o consumo de ATP. Este mecanismo produz um gradiente químico de Na^+ dez a quinze vezes superior ao normal, dirigido para o interior da célula acinar. A principal via de captura de Cl^- dependente de sódio nas células acinares é um co-transportador $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$ localizado na membrana basolateral. No entanto, a maioria das células acinares das glândulas salivares possuem uma segunda via de captura de Cl^- , os trocadores $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ e Na^+/H^+ emparelhados na membrana basolateral. Em conjunto, estas duas vias de aumento da concentração intracelular de Cl^- , dependentes de Na^+ , conseguem aumentar a concentração de Cl^- intracelular mais de 5 vezes acima do seu gradiente electroquímico. Este aumento da concentração de Cl^- intracelular é um requisito essencial para a saída de Cl^- pelos canais de cloro presentes na membrana apical das células acinares (Melvin *et al.*, 2005).

A secreção ocorre quando os canais de K^+ e Cl^- localizados respectivamente na membrana basal e apical abrem após estimulação por um agonista. Os canais de Cl^- são a via de saída dos iões Cl^- para o lúmen do ácino. A activação dos canais de K^+ é necessária para a manutenção do gradiente electroquímico que conduz à saída de Cl^- . A activação dos canais de K^+ e de Cl^- provoca uma perda rápida de iões K^+ e Cl^- intracelulares, para o fluido intersticial e para o lúmen respectivamente, conduzindo à formação de uma diferença de potencial transepitelial. A diferença de potencial eléctrico negativo do lúmen origina a movimentação passiva de catiões intracelulares através das junções estreitas das células acinares. A consequente acumulação de iões no lúmen do ácino gera um gradiente osmótico transepitelial que conduz o movimento das moléculas de água, resultando na formação de uma secreção primária tipo plasma, cuja composição iónica reflecte as concentrações de Na^+ , K^+ e Cl^- do fluido intersticial em contacto com a membrana basolateral das células acinares (Melvin *et al.*, 2005).

A água é o componente principal da saliva, no entanto o mecanismo molecular pela qual a água é segregada pelas células acinares das glândulas salivares é desconhecido. O movimento da água parece ser mediado por vias paracelulares e por transporte transcelular, através dos canais de água. A membrana plasmática é a principal barreira ao transporte de moléculas de água. Em 1988, foi descrito pela primeira vez um canal de água, uma proteína integral de 28 kDa, designada de aquaporina 1. Nas glândulas salivares de mamíferos encontram-se algumas proteínas da família das aquaporinas como: AQP1, AQP3, AQP4, AQP5, e AQP8 (Melvin *et al.*, 2005; Ishikawa *et al.*, 2006).

No caso da aquaporina 5, esta proteína é expressa na membrana plasmática apical, na membrana lateral e em organelos intracelulares, mas não se encontra na membrana basal das células acinares das glândulas salivares (Takata *et al.*, 2004; Ishikawa *et al.*, 2005). Esta proteína encontra-se também nos grânulos secretores da glândula parótida de rato (Matsuki *et al.*, 2005). Encontra-se mRNA que codifica a proteína AQP5 em abundância em células acinares serosas de glândulas exócrinas de rato, como a parótida e a submandibular, mas não é expressa em órgãos como o rim ou o cérebro (Ishikawa *et al.*, 2006). A microscopia confocal de imunofluorescência revelou que a AQP5 além de estar presente nas células acinares, também se encontra presente nas células dos ductos interlobulares, nas glândulas parótidas de rato (Ishikawa *et al.*, 2005).

Estudos efectuados em ratos *knockout* para o gene da AQP5, demonstraram que a secreção proteica e a actividade da amilase na saliva não eram afectadas, mas a produção de saliva estimulada pela pilocarpina sofreu uma redução de cerca de 60 % em comparação com ratos *wild-type* (Ma *et al.*, 1999). Estes resultados indicam que a AQP5 desempenha um papel importante na secreção de água nas células acinares serosas e nas células dos ductos interlobulares das glândulas parótidas e submandibulares (Ma *et al.*, 1999; Ishikawa *et al.*, 2006).

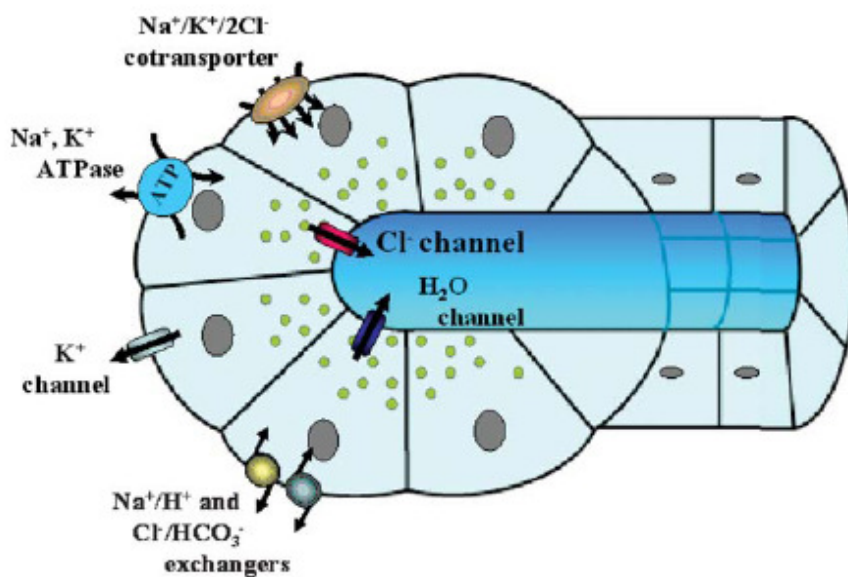


Figura 8: Esquema do modelo de secreção de fluido e electrólitos dependente de Cl^- (adaptado de Melvin *et al.*, 2005).

1.3.2- Modelo de secreção de fluido e electrólitos dependente de HCO_3^-

Apesar do movimento transepitelial de Cl^- ser a força condutora primária da secreção salivar, quando os co-transportadores que geram este gradiente são inibidos, continua a observar-se a secreção. A secreção resultante é dependente de HCO_3^- e aparentemente envolve múltiplos mecanismos. A maioria das células acinares das glândulas salivares possuem trocadores $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ e Na^+/H^+ emparelhados na membrana basolateral, os quais medeiam a troca de NaCl extracelular por H^+ e HCO_3^- intracelular (Case *et al.*, 1984; Lau *et al.*, 1990; Melvin *et al.*, 2005).

A contribuição do trocador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ para o movimento de Cl^- requer HCO_3^- intracelular, o qual é gerado pela catálise da reacção reversível da água e CO_2 pela anidrase carbónica, produzindo também nesta reacção protões, que são expelidos através dos trocadores Na^+/H^+ (Melvin *et al.*, 2005).

Tal como o efluxo de Cl^- , também o efluxo de HCO_3^- conduz directamente a secreção, porque os canais de Cl^- apresentam uma baixa discriminação entre aniões. A não selectividade destes canais e o facto do HCO_3^- ser o segundo ião mais abundante, indica

que o HCO_3^- contribui significativamente para a secreção salivar de fluido (Melvin *et al.*, 2005).

Várias observações estão de acordo com este modelo: a expressão de anidrase carbónica nas glândulas salivares, a redução da secreção provocada pelos inibidores da anidrase carbónica, o aumento de actividade dos trocadores durante a secreção estimulada e a inibição da secreção na presença de agonistas dos trocadores (Case *et al.*, 1984; Pirani *et al.*, 1987; Lau *et al.*, 1990; Evans *et al.*, 1999; Melvin *et al.*, 2005).

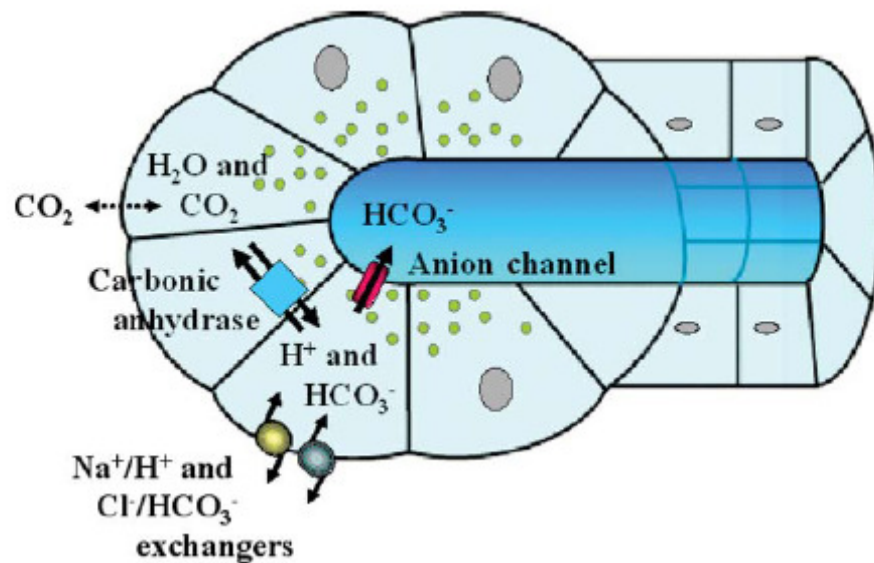


Figura 9: Esquema do modelo de secreção de fluido e electrólitos dependente de HCO_3^- (adaptado de Melvin *et al.*, 2005).

1.4- Mecanismos de secreção proteica das células acinares e sua regulação

A via principal de secreção proteica das células acinares é a exocitose dos grânulos de secreção. Esta via de secreção tem a orientação clássica para a superfície secretora apical da célula, onde se acumulam os grânulos secretores formados. Cerca de 85% das proteínas produzidas nas células acinares seguem por esta via de secreção. As proteínas entram no retículo endoplasmático durante o processo de tradução, a maior parte é transportada para o complexo de Golgi onde se completam as modificações pós-traducionais e posteriormente direccionadas para os vacúolos de condensação em formação. As proteínas nos grânulos sofrem condensação, atingindo concentrações de armazenamento que ultrapassam os 300 mg/mL. As restantes proteínas são segregadas sem um armazenamento prévio no interior de grânulos secretores (Amado *et al.*, 2005).

A activação de receptores muscarínicos M3, β 2-adrenérgicos, histamínicos H₂, NK1 e do VIP na membrana plasmática basolateral das células acinares das glândulas salivares pelos respectivos agonistas induzem a secreção proteica através da exocitose de grânulos secretores (Ishikawa *et al.*, 2006).

A fusão dos grânulos secretores com a membrana plasmática das células acinares, os quais estão na maioria presentes na zona apical das células acinares, é regulada por sinais intracelulares produzidos em resposta a neurotransmissores, tais como: acetilcolina, norepinefrina, histamina, substância P e VIP, de uma forma dose-dependente (Turner & Camden, 1992; Eguchi *et al.*, 1998; Ishikawa *et al.*, 2006).

A estimulação dos receptores β 2 adrenérgicos induz um grande aumento na secreção proteica das glândulas salivares, enquanto que a estimulação dos receptores muscarínicos do tipo M3 induz um modesto aumento da secreção proteica (Ishikawa *et al.*, 1998; Ishikawa *et al.*, 2006).

A acetilcolina estimula a fosfolipase C β (PLC β) através da activação da proteína Gq/11 α acoplada aos receptores muscarínicos do tipo M3, dando origem aos mensageiros derivados de fosfolípidos, diacilglicerol (DAG) e inositol tri-fosfato (IP3). Por sua vez, o DAG activa a fosfocinase C (PKC) e induz a secreção proteica salivar, através da regulação do processo de exocitose (fig. 6) (Ishikawa *et al.*, 2006).

A norepinefrina actua nas glândulas salivares em ambos os receptores adrenérgicos ($\alpha 1$ e $\beta 2$). Em relação aos receptores $\beta 2$ -adrenérgicos, a norepinefrina activa a adenilciclase (AC), através da activação da proteína $G\alpha$, provocando o aumento da quantidade de AMPc (fig. 6). O aumento da quantidade de AMPc produz a activação da fosfocinase A (PKA) nas células acinares e induz a exocitose dos grânulos secretores sem um aumento significativo na concentração de cálcio intracelular. A activação dos receptores $\alpha 1$ -adrenérgicos, estimula a $PLC\beta$, levando à produção de IP_3 (Ishikawa *et al.*, 2006).

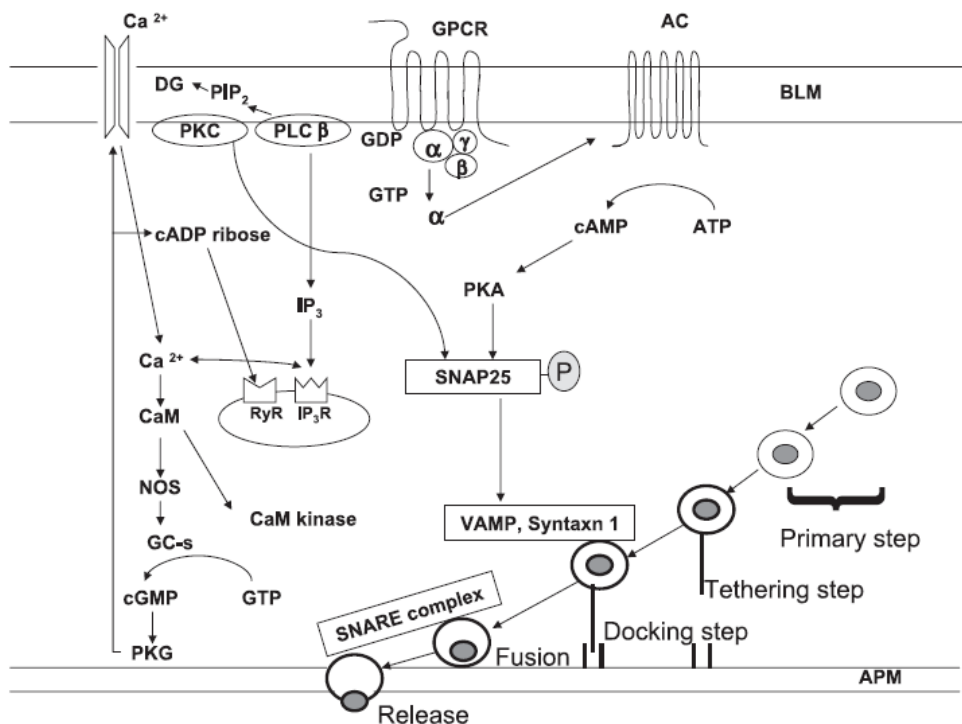


Figura 10: Representação esquemática das vias de transdução de sinal da glândula parótida utilizadas na exocitose regulada dos seus grânulos secretores (adaptado de Ishikawa *et al.*, 2006).

O IP_3 mobiliza cálcio das reservas intracelulares através da activação dos seus receptores. O aumento na concentração de cálcio intracelular é o sinal principal que despoleta a exocitose dos grânulos secretores. O modo como o cálcio é libertado depende da concentração dos primeiros mensageiros que levam à produção de IP_3 . Estudos efectuados com baixas concentrações de *cevimeline* e metacolina, agonistas colinérgicos, evocam a libertação de cálcio em células acinares de parótida isoladas (Ishikawa *et al.*, 2006).

A elevada concentração de agonistas evoca a libertação de Ca^{2+} , com um aumento rápido inicial, seguido por um declínio gradual para o nível observado em condições de repouso. A exocitose induzida por *cevimeline* e metacolina nas glândulas parótidas de rato é completamente inibida por BAPTA-AM, um quelante de cálcio; por KN-93, inibidor da calmodulina cinase II; por ML-9, inibidor da cinase das cadeias leves de miosina; por L-NAME, inibidor da óxido nítrico sintetase neuronal (nNOS) e por KT5823, um inibidor da fosfocinase G (Ishikawa *et al.*, 2006).

A exocitose induzida por *cevimeline* ou metacolina é inibida por dantroleno, que impede a libertação de Ca^{2+} por estruturas de armazenamento sensíveis à *ryanodine*. A nNOS é expressa em células de parótida de rato isoladas e a secreção de amilase em tecido de parótida induzida pela *cevimeline*, não se observou em ratos *knockout*, apesar da expressão de receptores colinérgicos M3 e da manutenção da indução da resposta secretora nos tecidos pelo isoproterenol. Estas observações sugerem a activação de enzimas dependentes de Ca^{2+} e de calmodulina e a activação da via de sinalização da óxido nítrico sintetase/fosfocinase G, na secreção proteica salivar induzida por *cevimeline* e metacolina (Ishikawa *et al.*, 2006).

As alterações na concentração de cálcio intracelular nas glândulas salivares, estão associadas com a libertação inicial de cálcio dos reservatórios intracelulares pelo IP3 e quer pela subsequente extrusão de cálcio mediada pela Ca^{2+} ATPase ao nível da membrana plasmática apical, quer pelo influxo de cálcio para o interior das células através de canais de Ca^{2+} (Ishikawa *et al.*, 2006).

Embora o Ca^{2+} seja a chave intracelular para despoletar a exocitose dos grânulos de secreção, também a PKC, em conjunto com a PKA regula a exocitose. O DAG gerado pela activação da PLC β activa a PKC. A PKC é uma família de isoenzimas, em que as (α , β e γ) PKC são activadas pelo Ca^{2+} e pelo DAG, as (δ , ϵ , η , e θ) PKC activadas pelo DAG e PKC atípicas (ξ e ι/λ), que não são activadas nem pelo Ca^{2+} nem pelo DAG. Como os ésteres de forbol actuam principalmente na regulação da exocitose via PKC, esta enzima é apontada como tendo um papel na modulação da secreção regulada (Morgan *et al.*, 2005; Ishikawa *et al.*, 2006).

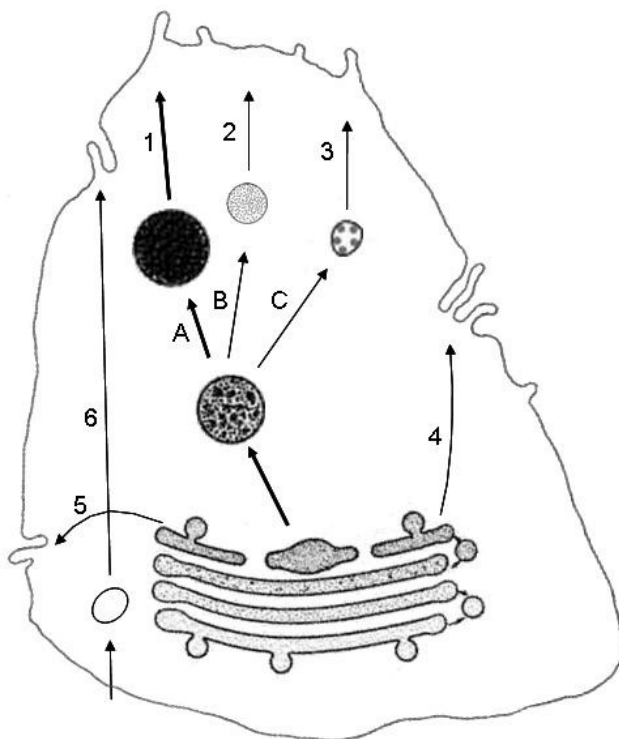
O local onde a PKC afecta o processo de exocitose, que é o seu substrato, ainda não é conhecido. Continuam em estudo as características das proteínas fosforiladas pela PKC no processo de exocitose. A fosforilação da SNAP-25 ocorre nas células β pancreáticas em

resposta a estímulos fisiológicos. A fosforilação da SNAP-25 contribui para formar complexos SNARE com a VAMP e a syntaxina 1. Pensa-se que a formação de complexos SNARE medeia a ligação e fusão das vesículas ao nível da membrana plasmática (Rhee *et al.*, 2002; Ishikawa *et al.*, 2006).

O AMPc regula a exocitose em várias células secretoras, mas o aumento isolado de AMPc, na ausência do aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} , não é suficiente para despoletar a exocitose. No entanto, nas glândulas salivares, parótidas e submandibulares, o AMPc despoleta directamente a exocitose dos grânulos secretores, sem aumentos significativos da concentração intracelular de Ca^{2+} . Na glândula parótida, a quantidade de amilase segregada devido ao aumento da concentração de cálcio intracelular é menor que a induzida pelo aumento de AMPc (Baldys-Waligorska *et al.*, 1987; Ishikawa *et al.*, 2006).

1.4.1- Vias de secreção nas células acinares da parótida

A secreção proteica nas células acinares da parótida de rato ocorre quer na presença, quer na ausência de agonistas. A libertação ocorre por quatro vias distintas, que foram distinguidas pela composição relativa de proteínas, pela sensibilidade da resposta a estímulos secretores e pelo tempo de resposta, após marcação bioquímica (Castle & Castle, 1998; Gorr *et al.*, 2005).



1. Via principal de secreção regulada.
2. Via secundária de secreção regulada.
3. Via de secreção tipo constitutiva.
4. Via de secreção constitutiva apical.
5. Via de secreção constitutiva basolateral.
6. Transporte de Imunoglobulina A

Figura 11: A- Processo de formação de grânulos secretórios maduros, através da retenção de proteínas. Este processo sofre influência do pH. Neste processo são importantes as proteoglicanas sulfatadas (proteoglicanas ácidas) no armazenamento de proteínas-ricas em prolina ácidas. O tratamento destas células com bases fracas, interfere com a retenção das proteínas nos grânulos secretórios. Alterações nas quantidades relativas de proteínas ácidas e básicas podem afectar o armazenamento nos grânulos secretórios. B- As vesículas desta via de secreção resultam da maturação dos grânulos secretórios imaturos. C- As vesículas desta via de secreção resultam da maturação dos grânulos secretórios imaturos e apresentam uma baixa quantidade de proteína secretora da parótida (adaptado de Gorr *et al.*, 2005).

1.4.1.1- Secreção regulada

As células acinares da parótida exibem duas vias de secreção regulada, que segregam proteínas em resposta a estimulação extracelular (Castle & Castle, 1998). A via principal de secreção regulada, envolve os grânulos secretores, que sofrem exocitose em resposta à estimulação adrenérgica e muscarínico-colinérgica (Gorr *et al.*, 2005). Esta é a via clássica de exocitose de grânulos secretores nas células exócrinas, sendo responsável pela secreção de 80-90% das proteínas segregadas pelas células acinares da parótida (Palade, 1975; Castle & Castle, 1998).

A via secundária de secreção regulada tem origem na maturação dos grânulos secretores imaturos. Pequenas vesículas de transporte resultantes da maturação dos grânulos secretores são segregadas em resposta à pilocarpina e a baixas doses de isoproterenol, condições que não estimulam a secreção dos grânulos secretores maduros. (Castle & Castle, 1996; Gorr *et al.*, 2005).

1.4.1.2- Secreção constitutiva

A via de secreção constitutiva, comum a todas as células eucarióticas, segrega proteínas na ausência de estimulação. Esta é a única secreção da parótida que não tem origem em grânulos secretores, mas na rede trans do complexo de Golgi, apresentando proteínas diferentes das presentes nos grânulos. Não foram ainda identificadas proteínas secretoras específicas desta via de secreção (Gorr *et al.*, 2005). É provável que uma das funções desta via de secreção seja a entrega das proteínas da membrana plasmática basolateral e os componentes da matriz extracelular (Castle & Castle, 1998; Gresz *et al.*, 2004; Gorr *et al.*, 2005).

Na via de secreção “tipo constitutiva”, as proteínas entram inicialmente nos grânulos secretores imaturos, mas são removidas durante a maturação do grânulo, sendo segregadas na ausência de estimulação. É uma secreção com baixa quantidade de proteína secretora da parótida (PSP). As vesículas de transporte nesta via de secreção transportam proteínas não retidas nos grânulos secretores durante a maturação, contribuindo assim para

a secreção basal das células acinares da parótida (Castle & Castle, 1998; Huang *et al.*, 2001; Gorr *et al.*, 2005).

1.4.1.3- Transporte de imunoglobulina A

A imunoglobulina A (IgA) é transportada através das células epiteliais pelo PigR (*Poly immunoglobulin Receptor*), o qual é inicialmente expresso na membrana basolateral. Após a ligação da IgA dimérica ou polimérica, contendo a cadeia J, o receptor sofre endocitose e é transportado por estruturas vesiculares para a membrana apical. Na membrana apical o receptor sofre clivagem para libertar SIgA₂-IgA covalentemente ligados ao componente secretor. As IgA são produzidas localmente pelos plasmócitos residentes. A estimulação quer simpática quer parassimpática da glândula parótida provoca um aumento da secreção de IgA na saliva. Mesmo na ausência de estimulação nervosa continua a ocorrer secreção de IgA na saliva, mas em menor quantidade (Carpenter *et al.*, 2004).

1.5- Caracterização dos grânulos secretores

Os grânulos secretores são organelos intracelulares altamente especializados, que servem para a acumulação e armazenamento dos produtos de secreção dentro de uma membrana delimitante no interior da célula. Os grânulos secretores contribuem também para uma libertação regulada do seu conteúdo para o meio extracelular via exocitose (Arvan & Castle, 1998).

Os grânulos secretores da parótida geralmente aparecem como estruturas electrodensas ao microscópio electrónico de transmissão (Gorr *et al.*, 2005).

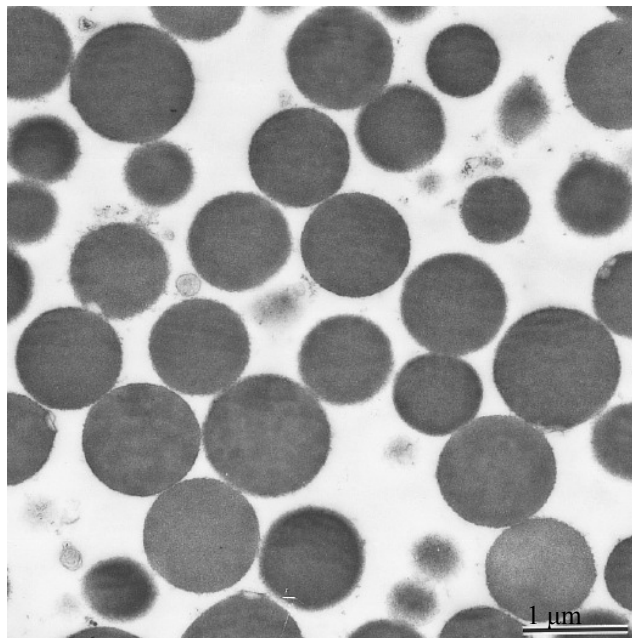


Figura 12: Fotografia de grânulos secretores da parótida por microscopia electrónica de transmissão (adaptado de Dohke *et al.*, 1998).

Os grânulos secretores da parótida de rato, ocupam 31% do volume da célula acinar, apresentando cerca de um micrómetro de diâmetro (Arvan & Castle, 1998).

A caracterização do conteúdo dos grânulos secretores da parótida por SDS-PAGE, efectuada por Wallach *et al.* (1975), mostrou a presença de cinco proteínas principais e um número limitado de componentes menores. Apenas duas das principais bandas foram identificadas como sendo enzimas secretoras da glândula parótida, uma a alfa-amilase e outra a deoxiribonuclease (Wallach *et al.*, 1975).

As proteínas presentes nos grânulos secretores da parótida de rato, na membrana dos grânulos e na membrana plasmática das células acinares foram caracterizadas por Cascieri em 1983, utilizando electroforese bidimensional em gel de poliacrilamida e visualizadas por coloração com prata. O conteúdo proteico dos grânulos secretores apresentou 122 polipeptídeos com pesos moleculares de 11000 a 138000 Da e pontos isoeléctricos de 4.8 a 6.55. A membrana dos grânulos secretores contém 166 polipeptídeos com pontos isoeléctricos entre 4.75 e 6.45 e peso moleculares entre 17000 e 190000 Da. Em relação à membrana plasmática das células acinares estas apresentam 172 polipeptídeos, com pesos moleculares entre 17000 e 200000 Da e pontos isoeléctricos de 5.0 a 6.8. Trinta e cinco proteínas da membrana plasmática estão também presentes na membrana dos grânulos secretores, indicando que existem algumas propriedades enzimáticas e estruturais em comum (Cascieri & Somberg, 1983).

1.5.1- Biogénese dos grânulos secretores

Os grânulos secretores formam-se a partir da rede tubular trans do complexo de Golgi (TGN) de duas formas distintas: pela projecção de vesículas ou pela maturação da própria rede tubular (Gorr *et al.*, 2005).

A formação de grânulos secretores a partir da projecção de vesículas inicia-se como uma evaginação da TGN, para originar um vacúolo de condensação, que inicialmente é contínuo com a TGN e contém as proteínas que ali se concentram. Pensa-se que a deformação da membrana da rede tubular pode resultar da agregação de proteínas a segregar, não sendo necessário um processo de revestimento das vesículas com proteínas (COP I, COP II ou clatrina), como é necessário para as vesículas de transporte formadas em etapas anteriores da via secretora (Brodsky *et al.*, 2001; Morgan *et al.*, 2003). A formação dos vacúolos de condensação (VC) implica a dilatação progressiva do lúmen da rede tubular. A análise morfológica dos VC em relação à restante rede tubular mostrou que existe uma relação inversa entre o tamanho dos grânulos formados e a restante TGN (Clermont *et al.*, 1995). Apesar da estreita relação entre VC e grânulos secretores imaturos (GSI), estes compartimentos devem ser distinguidos. Os VC são contíguos fisicamente com a rede tubular do Golgi enquanto que os GSI não, apresentando os segundos já competência para uma secreção dependente de estímulos (Tooze, 1991).

Os VC nascentes têm de ser expulsos para originar os GSI. O colesterol é essencial neste processo, levando a sua depleção à interrupção da formação de grânulos secretores e à acumulação de VC imaturos de núcleo denso observáveis na TGN (Wang *et al.*, 2000).

Os GSI parecem não estar completamente revestidos por proteínas de revestimento, apresentando somente alguns locais recobertos com clatrina, sugerindo que o revestimento de clatrina não está envolvido na biogénese dos grânulos, mas intervém na eliminação de membrana durante a sua maturação (Brodsky *et al.*, 2001). A formação dos GSI não é muito específica, encontrando-se nestes proteínas características dos lisossomas e outras ausentes nos grânulos secretores maduros (GSM). No entanto, da maturação dos GSI resultam GSM altamente enriquecidos em proteínas salivares, devido à remoção de proteínas não específicas dos grânulos e do excesso de membrana (Gorr *et al.*, 2005). Normalmente, em condições fisiológicas, os GSI são maiores ou de tamanho comparável aos GSM (Arvan & Castle, 1998).

A formação de grânulos secretores pela maturação da rede tubular do complexo de Golgi baseia-se no modelo de maturação das cisternas do complexo de Golgi. Assim, os grânulos de secreção formados resultam de vesículas deixadas para trás quando a membrana da rede tubular e proteína retornam para cisternas mais precoces por transporte retrógrado. A maturação dos grânulos resulta de maturações compartimentais consecutivas na via secretora, contudo apresenta uma importante diferença, as proteínas removidas dos grânulos secretores em maturação não retornam ao complexo de Golgi, sendo transportadas para a superfície da célula para exocitose (Elsner *et al.*, 2003).

Em ambos os modelos de formação de grânulos secretores, a maturação dos grânulos requer que as proteínas secretoras sejam retidas nos grânulos em maturação de uma forma eficiente (Arvan & Castle, 1998).

Para as células endócrinas foi proposto que proteínas específicas como a cromogranina A e a cromogranina B actuem como interruptores para a formação de grânulos secretores (Kim *et al.*, 2001; Huh *et al.*, 2003). As bases deste mecanismo não foram ainda demonstradas, presumindo-se que este efeito é devido às propriedades de agregação destas proteínas em conjunto com a propensão para interagir com as membranas, promovendo o revestimento do agregado de cromogranina pela membrana da TGN (Burgoyne & Morgan, 2003; Gorr *et al.*, 2005). Estas cromograninas apresentam uma expressão restrita, encontrando-se apenas em tecidos nervosos e endócrinos, indicando que

existem outras proteínas ainda não identificadas que preenchem esta função noutros tipos celulares. Por exemplo, estas proteínas são armazenadas nas células acinares do cavalo, mas não estão presentes nas glândulas parótidas de rato, sendo improvável que actuem como interruptor *on/off* para a biogénese dos grânulos secretores das glândulas salivares (Sato *et al.*, 2002; Gorr *et al.*, 2005).

Outra hipótese para a biogénese dos grânulos secretores proposta por Beuret *et al.* (2004), trata-se de um possível “efeito de carga”, em que níveis elevados de proteínas secretoras na TGN induzem a formação de complexos de proteína, que posteriormente são envolvidos por membrana, formando grânulos secretores (Beuret *et al.*, 2004).

1.5.1.1- Mecanismos de selecção e armazenamento de proteínas nos grânulos

Existem duas hipóteses diferentes para explicar a selecção das proteínas contidas nos grânulos secretores: a hipótese de *sorting for entry* e a hipótese *sorting by retention*, hipóteses que não são mutuamente exclusivas (Arvan & Castle, 1998).

A hipótese de *sorting for entry* baseia-se na suposição que a TGN actua como o primeiro operador na selecção das proteínas na via biosintética de transporte. Pensa-se que este processo se inicia pela agregação selectiva das proteínas secretoras na TGN, seguida pela interacção do agregado com a membrana do TGN, a qual pode envolver moléculas receptoras (Tooze, 1998). Também é possível que essa selecção se efectue pela ligação individual de proteínas secretoras com um receptor membranar antes da agregação; no entanto como os receptores não são suficientes para uma relação estequiométrica de 1:1 com as proteínas secretoras reguladas, uma versão mais recente desta hipótese sugere que na TGN, as proteínas secretoras reguladas podem ligar-se a receptores da membrana nascente do grânulo ou a outras proteínas secretoras reguladas já ligadas (Arvan & Castle, 1998). Pensa-se que as proteínas que não interagem com os receptores da membrana do grânulo nascente, ou que não agregam com as outras proteínas secretoras reguladas saem da TGN em vesículas secretoras constitutivas (Tooze, 1998; Arvan & Castle, 1998).

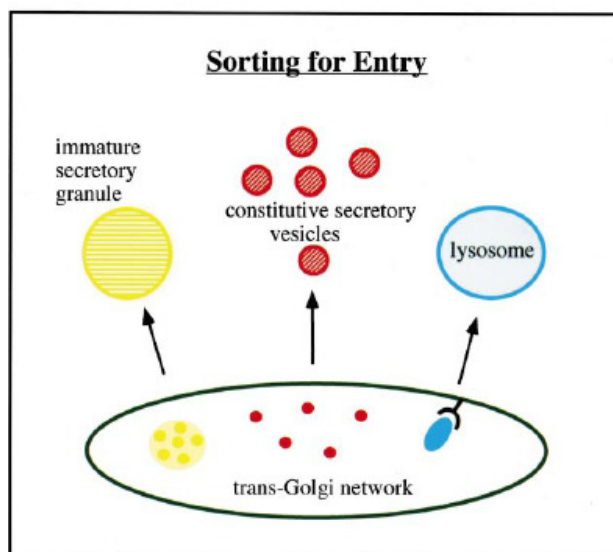


Figura 13: Esquema representativo da hipótese de *sorting for entry* (adaptado de Tooze, 1998).

A hipótese de *sorting by retention* considera que os grânulos imaturos servem como extensões funcionais da rede trans do Golgi, adquirindo alguns mecanismos de selecção em adição à selecção de proteínas efectuada anteriormente pelo armazenamento ou não no interior do vacúolo de condensação (Castle *et al.*, 1992). A entrada das proteínas nos vacúolos de condensação não depende da TGN, não sendo necessária a ligação directa ou indirecta a proteínas da membrana do Golgi que delimitem os vacúolos em formação nem a receptores existentes para o efeito. A entrada de proteínas nos GSI não necessita que cada proteína esteja incluída num complexo insolúvel; se houver espaço livre nos vacúolos, as proteínas que se encontram no lúmen podem entrar nos vacúolos da via secretora em formação (Arvan & Castle, 1998).

Segundo esta hipótese a selecção de proteínas secretoras reguladas na TGN ocorre passivamente, seguindo-se a remoção de algumas proteínas dos grânulos imaturos através da saída de vesículas. As proteínas de secreção reguladas participam em estruturas de elevada organização intermolecular que levam à sua eficiente retenção dentro dos grânulos maduros. A maturação dos grânulos secretores ocorre através da remoção mediada por receptores de determinados ligandos, em conjunto com uma fracção de proteínas secretoras que não possuem propriedades de retenção, através de vesículas de secreção (Arvan & Castle, 1998).

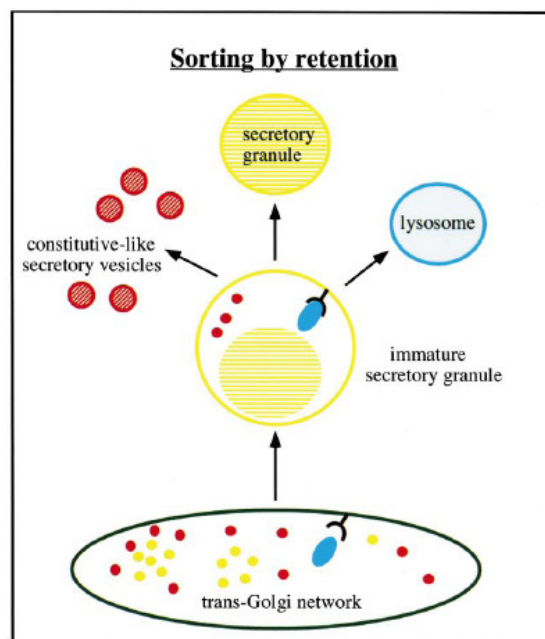


Figura 14: Esquema representativo da hipótese de *sorting by retention* (adaptado de Tooze, 1998).

1.5.1.2- Retenção de proteínas nos grânulos secretores

As proteínas secretoras são armazenadas em concentrações elevadas nos grânulos secretores e para isso contribuem factores como o pH, a concentração de cálcio e a presença de proteínas sulfatadas. No entanto, o processo de retenção de proteínas nos grânulos das células acinares da parótida é diferente do que ocorre noutras células exócrinas e endócrinas (Gorr *et al.*, 2005).

Sendo os grânulos secretores os principais responsáveis pela secreção de proteínas nas células acinares, os mecanismos de retenção das proteínas nos grânulos são importantes reguladores da secreção proteica (Gorr *et al.*, 2005).

Ao contrário dos grânulos secretores exócrinos do pâncreas, os grânulos secretores das células acinares da parótida não necessitam de cálcio para manter a estabilidade, indicando que as proteínas exócrinas da parótida não formam complexos de armazenamento cálcio dependentes (Venkatesh *et al.*, 2004). Verificou-se que as proteínas segregadas pela parótida, amilase e proteína secretora da parótida (PSP), não apresentam agregação *in vitro* na presença de cálcio e/ou baixo pH, enquanto que a amilase pancreática

apresenta. Este facto sugere que o processo de agregação não é necessário para a selecção ou retenção de proteínas nas células acinares da parótida (Venkatesh *et al.*, 2004; Gorr *et al.*, 2005).

Os grânulos secretores da parótida são osmoticamente activos e sofrem lise em tampões com baixa força iónica, apresentando uma zona central pouco organizada, que não contém proteínas secretoras agregadas (Arvan *et al.*, 1984).

Alguns autores propuseram que em alternativa à agregação induzida pelo cálcio, as proteínas secretoras reguladas formavam complexos com proteoglicanas sulfatadas. As proteoglicanas sulfatadas são segregadas quer pela parótida quer pela submandibular; estando caracterizadas duas proteínas-ricas em prolina (PRPs) ácidas na glândula parótida de rato (Castle & Castle, 1993; Gorr *et al.*, 2005).

Segundo Gorr *et al.* (2005), as proteoglicanas sulfatadas armazenadas nos grânulos secretores da parótida são necessárias para o armazenamento eficiente de proteínas secretoras nos grânulos. O mecanismo de acção das proteoglicanas pode ser através da interacção directa com outros componentes do grânulo ou por acção no ambiente químico do grânulo. Possíveis interacções directas entre as proteínas secretoras e as proteoglicanas, através de uma função de ancoragem, em que estas moléculas estando anexadas à membrana, ligam-se a outras moléculas presentes no grânulo (Gorr *et al.*, 2005).

As proteoglicanas da parótida são armazenadas nos grânulos secretores em conjunto com proteínas secretoras básicas, incluindo PRPs básicas. A concentração de sulfato nos grânulos secretores aumenta durante a sua maturação, sustentando a hipótese das proteoglicanas desempenharem um papel no armazenamento das proteínas nos grânulos (Gorr *et al.*, 2005).

Segundo Venkatesh *et al.* (2004) e Gorr *et al.* (2002), a inibição da síntese de proteoglicanas reduz o armazenamento de amilase e de PSP recentemente sintetizada em cerca de 50% nos grânulos secretores da parótida. Esta inibição pode conduzir a uma perda relativa de cargas negativas, ou a um aumento global de cargas positivas, devido às PRPs básicas. Este efeito inibitório é revertido quando o tecido parotídeo é tratado com ácido acético, sugerindo que a acidificação dos grânulos secretores por um ácido fraco pode substituir a presença de proteoglicanas sulfatadas (Gorr *et al.*, 2005).

O pH dos GSI das glândulas salivares é ácido, começando a aumentar durante o processo de maturação, atingindo valores de pH próximos do neutro (Orci *et al.*, 1987).

Vários estudos demonstram que a selecção de proteínas secretoras reguladas nos grânulos secretores é perturbada pela alcalinização do meio, levando o aumento de pH nos grânulos secretores nascentes a um incremento da secreção basal de PSP e de proteína p32; verificando-se que o pH dos grânulos secretores imaturos é vital para garantir uma selecção correcta das proteínas secretoras (Gorr *et al.*, 2005).

As proteínas secretoras ácidas são agentes tampão, que desempenham um papel na selecção e armazenamento nas células secretoras. Nas células endócrinas e neuroendócrinas, este papel é desempenhado pelas cromograninas, nos mastócitos pelas proteoglicanas de heparina e nas células acinares da parótida pelas proteoglicanas de sulfato de condroitina; sendo os grânulos secretores da parótida organelos bem tamponados (Gorr *et al.*, 2005).

1.5.1.3- Mecanismos de exocitose dos grânulos secretores

Os mecanismos inerentes à exocitose dos grânulos secretores foram estudados utilizando os grânulos secretores isolados a partir de glândulas parótidas de rato. A libertação de amilase dos grânulos secretores isolados foi estimulada por ATP-Mg, mostrando que este processo é um processo iniciador. Nesta etapa, o ATP foi hidrolisado, sugerindo a presença de ATPases nos grânulos secretores. A libertação de amilase dependente de ATP foi inibida pelo EGTA, um quelante de cálcio, sugerindo alguma importância do cálcio nesta etapa. No entanto, a libertação de amilase dos grânulos secretores não se deveu somente ao ATP e à concentração de Ca^{2+} , foi também resultado do efeito estimulador do Ca^{2+} na presença de proteínas citosólicas. Alterações na turvação do meio de reacção contendo grânulos secretores na presença de proteínas citosólicas provenientes das glândulas parótidas, foi provocada pela adição de ATP-Mg e baixa concentração de cálcio, demonstrando as alterações conformacionais dos grânulos secretores nesta etapa. Estas alterações conformacionais foram confirmadas por microscopia electrónica. Sabe-se que o processo iniciador é ele próprio estimulado por baixos níveis de cálcio e por proteínas citosólicas. A necessidade de proteínas citosólicas, na etapa de secreção de grânulos secretores dependente de cálcio, sugere a importância da modificação de proteínas que actuam na exocitose dos grânulos secretores, como o factor

solúvel *N-ethylmaleimide-sensitive* (NSF) e os respectivos receptores (SNAREs) (Burgoyne & Morgan, 2003).

O *priming* (iniciação), *tethering* (travamento), *docking* (ancoragem), *fusion* (fusão) e *release* (libertação) são etapas sequenciais na exocitose dos grânulos secretores. Recentemente, tem sido proposta a ideia de exocitose *kiss and run*. Neste processo, o poro de fusão fecha rapidamente após a formação e expansão de um poro de fusão e a libertação do conteúdo dos grânulos. Evidências do processo de *kiss and run* foram demonstradas nas vesículas sinápticas, mas não no processo de exocitose dos grânulos secretores (Burgoyne & Morgan, 2003; Ishikawa *et al.*, 2006).

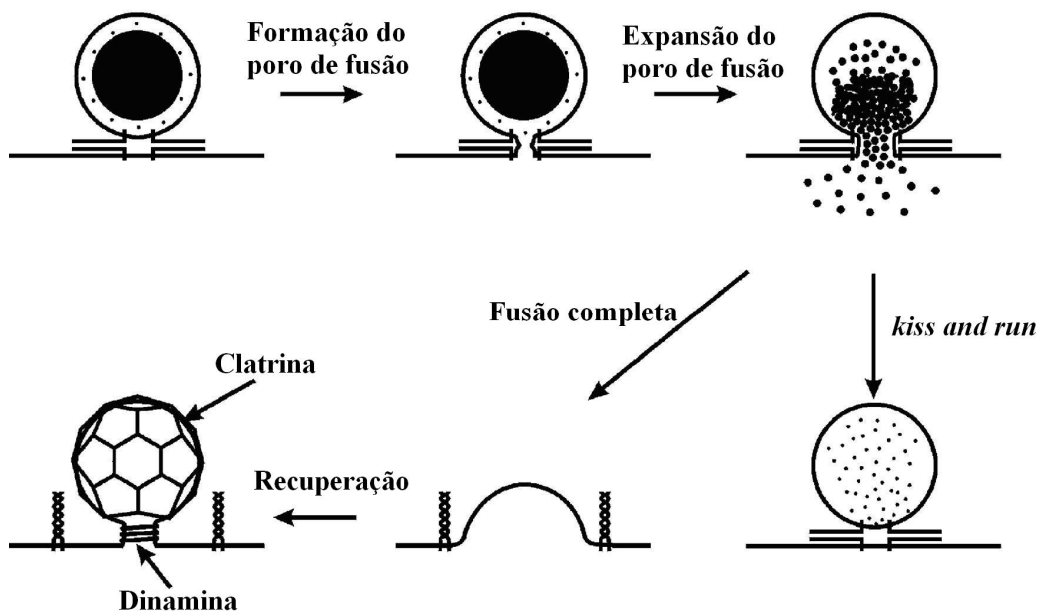


Figura 15: Representação esquemática do processo de exocitose por *kiss and run* e por fusão completa (adaptado de Burgoyne & Morgan, 2003).

A maquinaria exocítica das células acinares das glândulas salivares inclui SNAREs, ATPases, NSF, α -SNAP, Munc 18/Sec1, Munc13, sinaptogaminas, Rab3 e seus efectores. (Sollner *et al.*, 1993; Burgoyne & Morgan, 2003).

As SNAREs são proteínas de membrana presentes nas células acinares da parótida e são componentes básicos da exocitose. As SNAREs, originalmente descobertas como as proteínas sinápticas VAMP/sinaptobrevina, syntaxina e SNAP-25, foram redescobertas como os receptores para proteínas solúveis do tráfego do Golgi. A descoberta

concomitante de proteínas tipo SNARE requeridas para a secreção em leveduras indicou que elas executam uma função comum para todos os tráfegos de membrana. Apesar do grande número de proteínas SNARE, o complexo de SNARES sináptico, identificado por Sollner *et al.* (1993), compreende três proteínas e continua a ser o mais estudado. O complexo SNARE é constituído pelas proteínas integrais de membrana VAMP/sinaptobrevina e syntaxina 1 e pela proteína associada à membrana SNAP-25. A VAMP é uma proteína da vesícula sináptica, enquanto a syntaxina 1 e SNAP-25 estão presentes em maior quantidade na membrana plasmática pré-sináptica. Estas localizações conduziram à classificação das SNARES, ficando as proteínas SNARE associadas especificamente a vesículas (v-SNARE) e proteínas SNARE localizadas na membrana alvo (t-SNARE); estando geralmente presentes num único compartimento de membrana, sugerindo que direccionam especificamente o tráfego das vesículas. Todas as SNAREs são associadas com a membrana através de um domínio transmembranar único ou acilação e todas possuem uma ou mais α -hélices capazes de formar "coiled-coils". Estudos *in vitro* da ligação das SNARE têm revelado que as v e t-SNARE formam um complexo de alta afinidade que é resistente a SDS. A formação deste complexo aumenta a natureza α -helicoidal dos seus constituintes. Devido à especificidade da interacção v-SNARE:t-SNARE, considera-se que são estas proteínas que determinam a fidelidade da ancoragem e fusão das vesículas (Trimble *et al.*, 1988; Sollner *et al.*, 1993).

Mais recentemente um sistema de classificação rival foi proposto, baseado na presença de uma glutamina (Q) ou de uma arginina (R) no centro do *motif* das SNARES. No entanto, na prática, as Q-SNAREs são quase sempre t-SNAREs e as R-SNAREs são quase sempre v-SNAREs. A SNAP-25 é uma Q-SNARE e contém dois *motifs* SNARE. A VAMP-2, uma R-SNARE e a syntaxina 1, uma Q-SNARE, contendo cada uma um *motif* SNARE. Estes quatro *motifs* SNARE formam um complexo SNARE estável e medeiam a fusão dos grânulos secretores da parótida com a membrana plasmática (Fasshauer *et al.*, 1998; Ishikawa *et al.*, 2006).

Para o complexo SNARE ser reciclado, tem de ser desfeito após a exocitose. O NSF, uma ATPase e a α SNAP, uma proteína adaptadora, interagem com os *motifs* do complexo SNARE dissociando o complexo SNARE nos seus componentes individuais (Burgoyne & Morgan, 2003; Ishikawa *et al.*, 2006).

O Munc 18/Sec 1 foi descoberto no *C. elegans*, no mutante UNC-18 e na levedura, no mutante secretor Sec 1. Ambos foram também descobertos em mamíferos. O Munc 18 liga à syntaxina 1 e previne a formação do complexo SNARE. No entanto, um estudo recente demonstrou que o Munc 18 pode facilitar a formação do complexo SNARE, através da regulação da conformação da syntaxina 1. O Munc 13 promove a activação da syntaxina 1 para a formação do complexo SNARE, perturbando a interacção entre a syntaxina 1 e Munc 18 (Burgoyne & Morgan, 2003; Ishikawa *et al.*, 2006).

As proteínas Rab estão integradas na superfamília Ras de pequenas proteínas G, que funcionam no transporte vesicular. Pensa-se que estas proteínas actuam como interruptores moleculares, sendo no tempo em que estas se encontram activas, ou seja, ligadas a GTP, que as vesículas permanecem competentes para processo de ancoragem e fusão. Quando o GTP é hidrolisado, as proteínas Rab associadas ao GDP ficam inactivas. Os mamíferos apresentam muitas isoformas de proteínas Rab. A Rab 3 está envolvida na exocitose dos grânulos secretores e apresenta vários potenciais efectores, como a Rabfilina 3, Rims 1 e 3, Noc2 e granufilina. As glândulas salivares de ratos *knockout* para Noc2 apresentam uma marcada acumulação de grânulos secretores. A Rab3D e a Rab27B estão presentes nas células acinares da parótida; a Rab27B com a sua proteína efectora regula a formação do complexo SNARE (Burgoyne & Morgan, 2003; Ishikawa *et al.*, 2006).

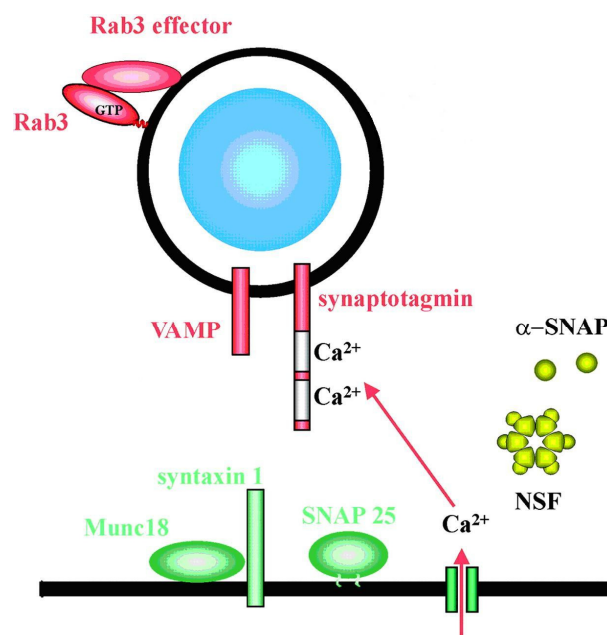


Figura 16: Esquema representativo das principais proteínas envolvidas no processo de exocitose dos grânulos secretores (adaptado de Burgoyne & Morgan, 2003).

1.6- Metodologia aplicada na identificação de proteínas

Em proteómica existem várias abordagens aplicadas ao estudo da composição proteica de determinada amostra biológica. O esquema seguinte apresenta de uma forma geral as abordagens mais comuns e actuais em proteómica:

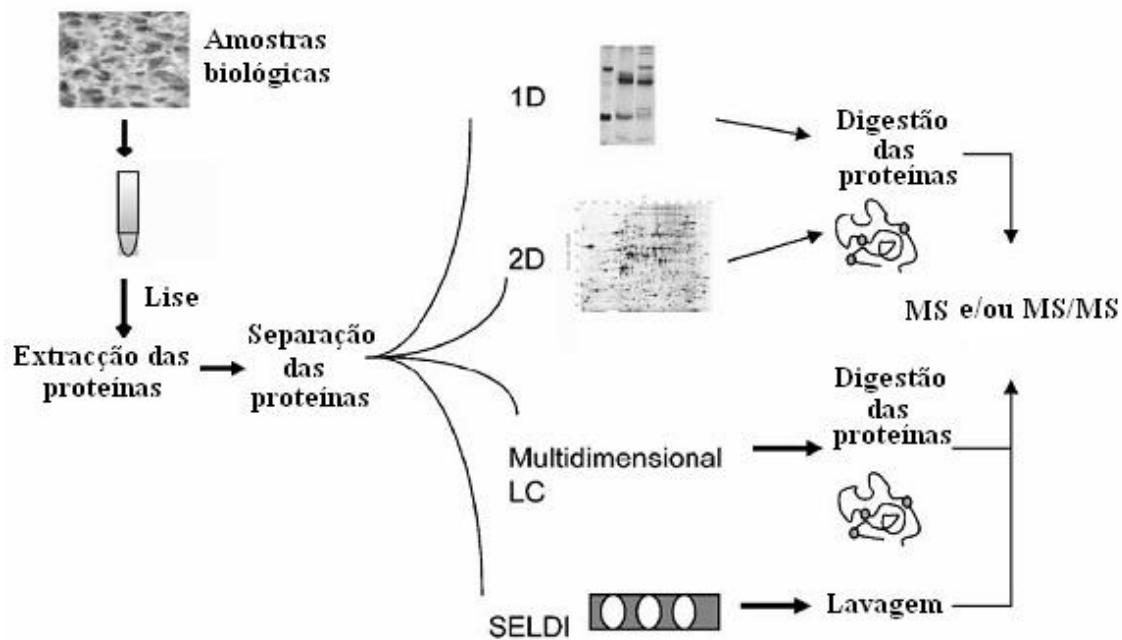


Figura 17: Esquema representativo das diferentes modalidades utilizadas na separação de proteínas de misturas complexas, 1DE, 2DE, LC e SELDI, seguida da sua identificação por MS e MS/MS (adaptado de Lim & Elenitoba-Johnson, 2004).

1.6.1- Técnicas separativas

1.6.1.1- Electroforese de uma dimensão em gel de poliacrilamida (1DE)

A separação de proteínas tornou-se possível com o desenvolvimento da electroforese em gel de poliacrilamida ou *PolyAcrylamide Gel Electrophoresis* (PAGE) em que às amostras a separar é adicionado o detergente SDS, pelo que a técnica é vulgarmente conhecida por SDS-PAGE. O detergente SDS é usado para desnaturar

proteínas com várias subunidades e para cobrir as moléculas da proteína com cargas negativas. Deste modo, a carga intrínseca à proteína é mascarada, e a razão carga/massa torna-se constante. Assim, as proteínas são separadas em função do seu peso molecular (MW) (Laemmli, 1970; Lim & Elenitoba-Johnson, 2004).

1.6.1.2- Electroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (2DE)

A 2DE foi introduzida em 1975 por O'Farrell e Klose, e desde aí têm-se verificado melhorias substanciais na técnica, melhorando a reprodutibilidade dos resultados. A 2DE é geralmente a técnica mais aplicada na separação e visualização de misturas complexas de proteínas. Em electroforese 2-D, as proteínas são separadas com base em duas das suas propriedades: na primeira dimensão, de acordo com o seu ponto isoeléctrico (pI) e, numa segunda dimensão, num gel de SDS-PAGE, de acordo com o seu MW. Ou seja, a electroforese 2-D resulta da combinação de duas técnicas: a focagem isoeléctrica (IEF), seguida de uma separação por SDS-PAGE, permitindo a observação de centenas de *spots* num único gel (Klose & Spielmann, 1975; O'Farrell, 1975).

Desde a introdução de gradientes de pH imobilizados e de sistemas com capacidade para correr várias amostras e géis em simultâneo, a técnica melhorou a capacidade de carga de amostra e tornou-se reprodutível entre diferentes laboratórios. Hoje em dia, a electroforese 2DE permite uma alta resolução das várias espécies proteicas presentes numa amostra biológica. Além da alta resolução e reprodutibilidade, a 2DE permite também separar as várias formas proteicas que tenham sofrido modificações pós-traducionais. A separação destas formas é possível visto que essas modificações conferem propriedades diferentes à proteína, mais propriamente um pI e MW diferentes (Lim & Elenitoba-Johnson, 2004; Verrills, 2006).

A 2DE apresenta desvantagens como o facto de ser uma técnica demorada e não funcionar bem com proteínas hidrofóbicas e de membrana. Esta técnica apresenta uma capacidade de carga de amostra limitada, combinada com uma sensibilidade de detecção limitada, a qual restringe a identificação de proteínas pouco abundantes (Verrills, 2006).

1.6.1.3- Cromatografia líquida (LC)

A cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) é uma técnica particularmente apropriada para a separação de péptidos e componentes de baixo peso molecular, com boa resolução e um tempo de separação relativamente curto (Guo *et al.*, 2006; Verrills, 2006).

A cromatografia líquida multidimensional (MDLC) é uma técnica de separação que melhorou consideravelmente o poder de resolução. A aplicação, por exemplo, de uma coluna de troca catiónica e uma de fase reversa em sequência, permite separar misturas complexas de péptidos como os digestos trípticos (Guo *et al.*, 2006).

A LC permite reduzir a complexidade das amostras, estando frequentemente acoplada a equipamentos de MS. As técnicas de LC apresentam ainda vantagens em relação aos géis de 2D porque não induzem modificações nos resíduos proteicos (Verrills, 2006).

1.6.1.4- Chips de proteínas /SELDI

A tecnologia de *chips* começou a ser aplicada ao campo da proteómica, no entanto, as proteínas são muito mais heterogéneas do que os ácidos nucleicos, não permitindo a criação de um chip para todas as proteínas. Assim, uma variedade de conjuntos de proteínas e péptidos têm sido desenvolvidos para analisar uma proteína específica ou um conjunto de proteínas (Azad *et al.*, 2006; Verrills, 2006).

Actualmente a maior vantagem desta tecnologia sobre as técnicas de separação tradicionais é o facto de permitir a análise de interações proteína-proteína, proteína-DNA ou proteína-RNA, dependendo do substrato ligado ao chip. Recentemente têm-se desenvolvido técnicas de MS baseadas na afinidade. A CIPHERGEN Biosystems, Inc, desenvolveu o *surface-enhanced laser desorption ionisation (SELDI) Protein Chip*®. Esta tecnologia envolve a captura por afinidade de subgrupos de proteínas, baseada nas suas propriedades físicas e bioquímicas, seguida da análise por MS. As diferentes superfícies incluem entre outras, superfícies hidrofóbicas, superfícies de troca aniónica e superfícies com iões metálicos imobilizados (Azad *et al.*, 2006).

Esta técnica apresenta especial vantagem na análise de proteínas de difícil análise por 2DE como proteínas pouco abundantes ou básicas. Esta técnica permite também a análise de amostras que contenham grandes quantidades de uma proteína, reduzindo bastante o “efeito de máscara” que ocorre nos géis 2DE (Verrills, 2006).

1.6.2- Identificação de proteínas

Na última década ocorreu uma revolução no campo da identificação de proteínas. O conhecimento do genoma de várias espécies, incluindo o humano, permitiu a construção de bases de dados de proteínas, que em combinação com a utilização de técnicas separativas, espectrometria de massa e ferramentas bioinformáticas permite uma rápida e fácil identificação de proteínas (Amado *et al.*, 2005).

Outro contributo para a identificação de proteínas por MS foi o desenvolvimento das técnicas de ionização suaves, como a *matrix-assisted laser desorption/ionization* (MALDI) e o *electrospray* (ESI), que possibilitam a análise de grandes biomoléculas em geral e de proteínas em particular por MS. Em MALDI, a amostra que se pretende analisar é incorporada numa matriz contendo componentes como o ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico que é activada por laser, levando à formação de iões da amostra que entram na fase gasosa e são analisados (Karas & Hillenkamp, 1988; Fenn *et al.*, 1989).

As proteínas isoladas a partir de géis ou fracções colectadas por cromatografia podem ser sujeitas a clivagem proteolítica por enzimas como a tripsina, com locais de corte específicos ou por enzimas proteolíticas sem especificidade no corte como a elastase (Lim & Elenitoba-Johnson, 2004).

A utilização de técnicas hifenadas, 2DE-MS, LC-MS e mais recentemente 2LC-MS, permitiram a identificação de um grande número de proteínas em misturas complexas, tornando-se as técnicas mais utilizadas hoje em dia. As técnicas 2DE-MS e 2LC-MS devem ser consideradas complementares, pois em estudos efectuados por Hu *et al.* (2005), apenas 33% das proteínas identificadas por ambos os métodos foram comuns.

A análise de digestos trípticos por MS é uma abordagem típica em proteómica. Os fragmentos resultantes da digestão podem ser analisados por MS e as proteínas identificadas por *peptide mass fingerprint* (PMF), na qual a massa molecular de cada péptido analisado é comparada com a massa prevista, obtida da digestão teórica disponível

em bases de dados genómicas e de proteínas. A utilização de dados adicionais provenientes da análise por espectrometria de massa tandem (MS/MS) também contribui para a identificação. Nesta abordagem o péptido de interesse é seleccionado, fragmentado e depois de analisado é efectuada uma nova pesquisa nas bases de dados (Amado *et al.*, 2005; Verrills, 2006).

1.7- Objectivos

Apesar das glândulas salivares apresentarem fulcral importância para a compreensão de determinadas patologias orais, o conhecimento da sua expressão proteica é ainda reduzido.

Assim, este trabalho apresenta como objectivo principal a caracterização da expressão proteica nas glândulas salivares de ratinho. Esta abordagem envolve o fraccionamento subcelular das glândulas parótida e submandibular, para uma melhor caracterização e localização das proteínas identificadas.

Aproveitando a recente evolução de metodologias e equipamentos na área da proteómica, este trabalho visa contribuir para um melhor conhecimento das glândulas salivares de ratinho e possibilitar o desenvolvimento de estudos subsequentes.

2- PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

2.1- Material

2.1.1- Reagentes

Os reagentes utilizados na realização deste trabalho eram de grau analítico.

- Ácido α -cyano-4-hidroxicinâmico e a mistura de calibrantes para o espectrômetro de massa MALDI TOF TOF 4800 Applied Biosystems, Applied Biosystems, Foster City, USA;
- CellLytic™ NuCLEAR™ Extraction Kit, NXTRACT, Sigma, St. Louis, USA;
- Colagenase P, Sigma, St. Louis, USA;
- Imobilinas pH 3-10, Amersham Pharmacia Biotech Europe, Uppsala, Sweden;
- Kit de quantificação de proteína, RC DC Protein Assay, 500-0119, BIO RAD, Hercules, USA;
- Tiras IPG (13 cm, pH 3-10), Amersham Pharmacia Biotech Europe, Uppsala, Sweden;
- Tripsina, Promega, Madison, USA;
- 2-D Clean-Up Kit, 80-6484-51, Amersham biosciences, Piscataway, USA.

2.1.2- Equipamentos

- Aparelho de focagem isoelétrica, IPGPhor, Amersham Pharmacia Biotech, Sweden;
- Câmara de fluxo laminar classe II, Microflow Bioquell, UK;
- Centrífuga, 2K 15, SIGMA, Germany;
- Espectrofotômetro, Genesys 6, Thermo, Madison, USA;
- Espectrômetro de massa, MALDI-TOF/TOF 4800 Proteomics Analyzer, Applied Biosystems, Foster City, USA;
- Fonte de alimentação para electroforese, EPS 601, Amersham Pharmacia Biotech, Sweden;

- Microcentrífuga, Mini Spin Plus, Eppendorf, Hamburg, Germany;
- Microscópio óptico composto, Zeiss, Germany;
- Microscópio electrónico de transmissão, Zeiss EM 10A, Germany;
- Módulo de HPLC, Ultimate 3000, LC Packings, USA;
- Speed Vac® Plus SC 210 A, Thermo Savant, USA;
- Tina de electroforese vertical, Hoefer SE 600 Series, Amersham Pharmacia Biotech, Sweden;
- Unidade de refrigeração, Multi Temp III, Pharmacia Biotech, Sweden.

2.1.3- Material Biológico

- Ratinhos macho Charles River CD1, Charles River Laboratories, Barcelona, Spain.

2.2- Métodos

2.2.1- Separação das fracções nuclear e citoplasmática das glândulas salivares

As fracções nuclear e citoplasmática das glândulas salivares foram separadas a partir das glândulas parótida e submandibular de ratinho. As glândulas salivares foram extraídas rapidamente de ratinhos sacrificados por deslocação cervical. O tecido glandular foi dividido em pedaços com a ajuda de um bisturi. Seguidamente o tecido foi homogeneizado, numa suspensão de 5% (m/v), num meio de homogeneização contendo: 340 mM de sacarose; 0.5 mM EDTA; 10 mM e pH 7.4. O homogeneizado foi centrifugado a 500 g durante 30 minutos a 4°C. O sobrenadante corresponde à fracção citoplasmática e o pellet à fracção nuclear.

2.2.2- Protocolo de isolamento de células acinares das glândulas salivares de ratinho

As células acinares das glândulas salivares foram dissociadas a partir das glândulas salivares de ratinho, seguindo um protocolo anteriormente descrito por Arreola *et al.* (2003). As glândulas salivares, parótidas e submandibulares, foram extraídas de ratinhos sacrificados por deslocação cervical. O tecido glandular foi dividido em pequenos pedaços, com a ajuda de um bisturi, sendo continuamente lavados com a solução A com um suplemento de albumina bovina a 1%. A composição da solução A era a composição de sais inorgânicos do meio essencial mínimo de Eagle *et al.* (1956) adicionada de glicose, que se encontra especificada na tabela seguinte:

<i>Componentes da solução A</i>	<i>Concentração em g/L</i>
Cloreto de Cálcio (anidro)	0.200
Sulfato de Magnésio (anidro)	0.097
Cloreto de Potássio	0.400
Cloreto de Sódio	6.800
Fosfato de Sódio Monobásico (anidro)	0.122
Glicose	1.000

Tabela 2: Componentes da solução A

Posteriormente o tecido foi tratado durante 20 minutos, a 37°C, com a solução A contendo 0.02% de tripsina, 1 mM EDTA, 2 mM glutamina e 1% de albumina bovina. A digestão foi interrompida com a adição de 2 mg/mL de inibidor de tripsina e o tecido disperso por dois tratamentos sequenciais de 60 minutos cada com 0.04 mg/mL de colagenase P, numa solução A contendo 2 mM de glutamina e 1% de albumina bovina. As células dispersas foram centrifugadas a 500 g e lavadas com a solução A. Observou-se ao microscópio óptico a qualidade das células isoladas, utilizando o corante vital azul tripan, repetindo-se as lavagens até as células acinares se encontrarem isoladas. Efectuou-se uma quantificação das células isoladas, através da contagem das células num hemocítmetro ao microscópio óptico. O pellet celular final foi congelado em azoto líquido e guardado a -70°C.

2.2.3- Extração da fracção citoplasmática das células acinares

Para efectuar a extração da fracção citoplasmática e nuclear das células acinares da parótida e da submandibular, utilizou-se o kit de extração N-XTRACT da Sigma.

Dissolveu-se o pellet celular no tampão de lise, contendo DTT e inibidor de proteases e homogeneizou-se suavemente no vórtex evitando a formação de espuma. De seguida incubaram-se as células 15 minutos em gelo e no final adicionou-se o detergente IGEPAL CA-630 obtendo uma concentração final na solução de 0.6%. Agitaram-se as amostras vigorosamente no vórtex durante 10 segundos e centrifugaram-se imediatamente durante 30 segundos a 11000 g. Removeu-se o sobrenadante, correspondente à fracção citoplasmática, para novos microtubos e guardaram-se na arca a -70°C.

2.2.4- Isolamento dos grânulos secretores das glândulas salivares

Os grânulos secretores das células acinares das glândulas salivares foram isolados a partir das glândulas salivares de ratinho, seguindo um protocolo anteriormente descrito por Patamia *et al.* (2005), com algumas modificações.

As glândulas salivares, parótidas e submandibulares, foram extraídas rapidamente de ratinhos sacrificados por deslocação cervical. O tecido glandular foi dividido em pedaços, removendo-se o tecido conjuntivo e adiposo com a ajuda de um bisturi. Seguidamente o tecido foi homogeneizado, numa suspensão de 5% (m/v), num meio de

homogeneização contendo: 340 mM de sacarose; 0.5 mM EDTA; 10 mM HEPES e pH 7.4. Para remover tecido conjuntivo fibroso e partículas insolúveis, o homogeneizado foi filtrado por filtros *milipore* de 10 μm . Depois de filtrado o homogeneizado foi centrifugado a 500 g durante 30 minutos a 4°C. O sobrenadante foi submetido a uma centrifugação de 2500 g durante 30 minutos a 4°C, correspondendo o respectivo pellet à fracção dos grânulos secretores.

A verificação do grau de pureza dos grânulos isolados, por microscopia electrónica de transmissão, efectuou-se de acordo Dohke *et al.* (1998). Procedeu-se à fixação de 50 μL de amostra de cada fracção a analisar em gluteraldeído a 2%. De seguida lavaram-se as amostras em tampão fosfato durante 4 horas. Posteriormente as amostras foram fixadas em tetróxido de ósmio, seguindo-se várias etapas de desidratação, utilizando álcoois de concentração crescente. Finalmente as amostras foram impregnadas e incluídas numa resina. Após o corte no micrótomo, foram observados vários cortes no microscópio electrónico de transmissão.

2.2.5- Remoção de interferentes à execução de 2DE presentes nas amostras

Para a remoção de impurezas das amostras utilizou-se o “2-D Clean-Up Kit” da Amersham Biosciences, que permite preparar as amostras para 2-DE. Adicionaram-se 300 μL de reagente precipitante a cada amostra a tratar e misturou-se bem com a ajuda do vórtex, seguindo-se uma incubação em gelo durante 15 minutos. Seguidamente adicionaram-se 300 μL de reagente co-precipitante e voltou-se a agitar a mistura. Centrifugaram-se os tubos a 15000 g durante 5 minutos. Após a centrifugação, removeu-se rapidamente o sobrenadante para evitar a ressuspensão do pellet, voltando a repetir-se esta acção após uma breve centrifugação, até não ficar nenhum líquido visível nos microtubos. Adicionou-se 40 μL de reagente co-precipitante ao pellet e incubou-se em gelo o tubo durante 5 minutos. Centrifugaram-se novamente os microtubos durante 5 minutos a 15000 g e removeu-se o sobrenadante. Posteriormente adicionou-se 25 μL de água destilada a cada pellet, e agitaram-se os microtubos no vórtex até os pellets estarem completamente dispersos. Adicionaram-se 1 ml de tampão de lavagem e 5 μL de aditivo de lavagem a cada microtubo e voltaram-se a agitar os microtubos até dispersar o pellet. Incubaram-se os tubos a -20°C durante 30 minutos, agitando-os no vórtex 20-30 segundos após cada 10 minutos de incubação. Centrifugaram-se novamente os microtubos durante 5 minutos a

15000 g e removeu-se cuidadosamente o sobrenadante. Deixou-se o pellet a secar ao ar durante 5 minutos e guardou-se na arca a -70°C.

2.2.6- Quantificação da proteína presente nas amostras

A quantificação de proteína presente nas amostras foi determinada através da utilização de um ensaio colorimétrico "RC DC protein assay" da BIO RAD. Este ensaio baseia-se numa modificação do protocolo de Lowry *et al.* (1951), permitindo a quantificação de proteína na presença de agentes redutores e detergentes.

Prepararam-se 5 diluições de um padrão de proteína desde 0.2 mg/mL a 2 mg/mL, para a construção de uma curva de calibração. Pipetaram-se 20 µL de amostras e de padrões para microtubos novos. Adicionaram-se 125 µL de reagente I em cada microtubo e agitaram-se no vórtex. Incubaram-se os microtubos 1 minuto à temperatura ambiente (TA). Adicionaram-se 125 µL de reagente II em cada microtubo e agitaram-se no vórtex. Centrifugaram-se os tubos a 15000 g durante 5 minutos. Decantou-se o sobrenadante e colocaram-se os tubos na "speedVac®", removendo a totalidade do líquido. De seguida adicionaram-se 127 µL de reagente A' a cada microtubo, agitaram-se no vórtex e incubaram-se durante 5 minutos à TA. Adicionou-se 1 mL de reagente B a cada microtubo e agitaram-se no vórtex imediatamente. Incubaram-se à TA durante 15 minutos. Após incubação, leram-se as absorvâncias num espectrofotómetro a 750 nm.

2.2.7- Electroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (2DE)

Misturou-se a quantidade de tampão de rehidratação necessária para solubilizar a amostra perfazendo um volume máximo de 250 µL. Aplicaram-se 250µL desta mistura na extremidade anódica do *IPG strip holder*. Depois, com a ajuda de uma pinça, retirou-se a parte protectora da tira e colocou-se no *IPG strip holder* começando por encaixar a tira do lado do ânodo. Levantou-se ligeiramente o *IPG strip holder* e foi-se mergulhando a tira lentamente, com o objectivo de evitar a formação de bolhas de ar debaixo da tira. Seguidamente adicionaram-se algumas gotas de óleo mineral cobrindo toda a tira, para evitar a desidratação. Finalmente, colocou-se o *IPG strip holder* no aparelho de focagem isoelectrica de acordo com as instruções do aparelho. Selecionou-se o programa

pretendido e indicou-se o número de tiras utilizadas. O programa de focagem isoelétrica compreendeu as seguintes fases (temperatura a 20°C):

- i. 12h de rehidratação a 50mW
- ii. 2h 150 Volts (GRADIENT)
- iii. 1h a 500 Volts (GRADIENT)
- iv. 1h a 1000 Volts (GRADIENT)
- v. 2h a 8000 Volts (STEP-N-HOLD)

Depois de decorrido o tempo de focagem retiraram-se as tiras e secaram-se com papel de filtro. Introduziu-se cada tira num tubo de plástico e adicionou-se-lhe 5 mL de tampão de equilíbrio, ficando a agitar durante 15 minutos. As tiras foram aplicadas no cimo de um gel de SDS-PAGE (12 cm x 14 cm; 12.5%) após lavagem com tampão de corrida. Aplicou-se uma solução selante de agarose e um separador que serve para a aplicação dos marcadores de peso molecular. Depois da agarose solidificar retiraram-se os separadores e aplicaram-se os marcadores de peso molecular. Introduziu-se o sistema dentro da tina de electroforese e iniciou-se a corrida com 200 V, 75 mA e 15 W. Deixou-se correr a electroforese até o corante atingir a parte inferior do gel.

2.2.8- Revelação dos géis de 2-DE

2.2.8.1- Revelação com prata reversível

A revelação com prata reversível realizou-se de acordo com Yan *et al.* (2000). Retiraram-se os géis da cassette e colocaram-se em agitação na solução fixadora durante 30 minutos. Lavaram-se com água destilada e colocaram-se em agitação na solução de sensibilização durante 30 minutos. Lavaram-se os géis novamente em água destilada duas vezes durante 7 minutos. Seguidamente agitaram-se os géis em nitrato de prata durante 20 minutos. Voltaram-se a lavar os géis em água destilada durante 1 minuto. De seguida, agitaram-se os géis na solução reveladora, até ser suficiente para se observarem os *spots* com uma boa resolução e depois adicionou-se EDTA agitando novamente durante 10 minutos para fixar os *spots*.

2.2.8.2- Revelação com coomassie coloidal

Para a identificação de proteínas, os géis foram revelados com coomassie coloidal de acordo com Bradford *et al.* (1976). Retiraram-se os géis da cassette e fixaram-se os *spots* colocando os géis em agitação durante 2 horas na solução de 40% metanol/10% ácido acético. Seguidamente retirou-se a solução de fixação e colocou-se uma solução de coomassie coloidal G250 durante 12 horas. A descoloração efectuou-se através de duas lavagens de 45 minutos utilizando uma solução de 25% de metanol. Finalmente colocou-se o gel em água destilada.

2.2.9- Análise dos dados de 2DE

Os géis foram digitalizados em duplicado (FX; Bio-Rad, Hercules, USA), e as imagens foram processadas pelo software PDQuest (v 7.1; Bio-Rad). A quantificação da proteína de cada *spot* foi executada nas imagens dos géis 2DE baseada nas densidades ópticas. Todos os dados obtidos foram exportados para o SPSS 11.5 para análise estatística.

2.2.10- Nano-HPLC de digestos trípticos de péptidos

A extracção dos péptidos dos grânulos salivares efectuou-se de acordo com Patamia *et al.* (2005). A uma fracção de grânulos secretores, adicionou-se num microtubo 250 μL de ácido acético 1 M e refrigerou-se a 4°C durante 4 horas. De seguida centrifugou-se a amostra, recolhendo o sobrenadante contendo os péptidos para um novo microtubo. A 20 μL de pellet contendo péptidos dos grânulos secretores adicionaram-se 100 μL de hidrogenocarbonato de amónio e 20 μL de tripsina (0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) e digeriram *overnight* a 37°C. A reacção foi parada pela acidificação por adição de TFA até a concentração final de 0.1%. As amostras foram secas na SpeedVac® e ressuspendidas em 6% de ACN/ 0.1% TFA.

A separação por nano-HPLC foi executada no módulo de separação Ultimate 3000 (LC Packings) utilizando uma coluna capilar (C18 Zorbax SB 300; 0.75 μ m diâmetro interno; 15 cm comprimento). Utilizou-se o solvente A, água/ACN/TFA (95:5:0.05, v/v/v) e solvente B, água/ACN/TFA (20:80:0.04, v/v/v). Foi injectada 1 μ L de amostra (3 μ g/ μ L). A separação foi executada utilizando um gradiente linear (5-55% A, durante 30 minutos; 55-80% A, durante 10 minutos e 80-5% A, durante 5 minutos) com um caudal de 100 nL/min. As diversas fracções separadas foram aplicadas numa placa de MALDI para análise.

2.2.11- Identificação de proteínas

2.2.11.1- Digestão das proteínas com tripsina

A tripsina é uma protease serínica que cliva especificamente as ligações peptídicas no lado carboxílico da arginina e da lisina. No entanto, quando uma prolina se encontra do lado carboxílico de uma arginina ou lisina, normalmente a tripsina não consegue clivar a ligação. A capacidade de clivagem da tripsina também é consideravelmente reduzida quando resíduos ácidos estão presentes no mesmo lado de uma potencial ligação susceptível. A tripsina não modificada é alvo de proteólise, gerando fragmentos que podem interferir com a análise de proteínas ou transformando-se em pseudotripsina, exibindo especificidade tipo quimiotripsina. (Keil-Dlouha *et al.*, 1971; Rice *et al.*, 1977; Wilkinson, 1986).

O protocolo de digestão tríptica realizou-se de acordo com Detweiller *et al.* (2002), utilizando tripsina porcina modificada (Promega Corporation, U.S.A.). Os *spots* de proteína foram extraídos do gel com a ajuda de uma espátula e colocados em microtubos. Os pedaços de gel foram lavados duas vezes com bicarbonato de amónio 50 mM /50% ACN e desidratados na “speedVac®”. De seguida, adicionaram-se 20 μ L de tripsina 10 μ g/mL em bicarbonato de amónio 50 mM a cada amostra e incubaram-se na estufa a 37° C durante a noite. Depois da digestão removeram-se os péptidos extraídos para novos microtubos e desidrataram-se completamente na “SpeedVac®”.

2.2.11.2- Espectrometria de massa

Segundo Detweiller *et al.* (2002), depois da digestão, reconstituíram-se os péptidos em 5 μ L de uma solução 50:50 de água/ACN 0.1% ácido fórmico. Aplicou-se em cada ponto da placa de MALDI 0.5 μ L de amostra e 0.5 μ L de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico preparado em 50% ACN/0.1% ácido fórmico e deixou-se secar. Os espectros foram efectuados num espectrómetro de massa MALDI-TOF-TOF (4800 Proteomics Analyzer; Applied Biosystems) com o reflectron em modo positivo e obtidos espectros no intervalo de massas desde os 800-4000 Da, com 1500 tiros de laser. Os picos resultantes da autólise da tripsina serviram como calibradores internos do aparelho. Se não se encontrassem picos de tripsina utilizava-se um calibrante externo.

2.2.11.3- Pesquisa nas bases de dados

Os espectros foram processados e analisados pela “Global Protein Server Workstation”, da Applied Biosystems, utilizando o software Mascot (Matrix Science Ltd, UK) para a pesquisa dos “peptide mass fingerprints” e dos dados de MS/MS nas bases de dados não redundantes da SwissProt e da NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). Para uma maior confiança nos resultados das identificações foram utilizados nas pesquisas tanto os espectros de MS como os de MS/MS. Os desvios introduzidos na pesquisa para identificação das proteínas para dados de MS e de MS/MS foram de ± 40 ppm e de ± 0.3 Da, respectivamente. A identificação da proteína foi aceite quando o grau de confiança era superior a 98%.

3- RESULTADOS

Neste trabalho efectuou-se o fraccionamento das glândulas salivares, parótida e submandibular de ratinho. Em cada glândula foram analisadas diferentes fracções: fracção nuclear e citoplasmática do tecido glandular, citoplasma de células acinares e grânulos secretores.

3.1- Fraccionamento da glândula parótida

3.1.1- Fracção citoplasmática

Nos géis 2DE da fracção citoplasmática de parótida, após revelação com prata, observaram-se 195 ± 27 spots. Destes spots, 107 ± 15 encontravam-se na zona correspondente a proteínas de peso molecular entre 40-90 kDa. Não se observaram diferenças significativas relativamente à distribuição das proteínas ácidas ou básicas.

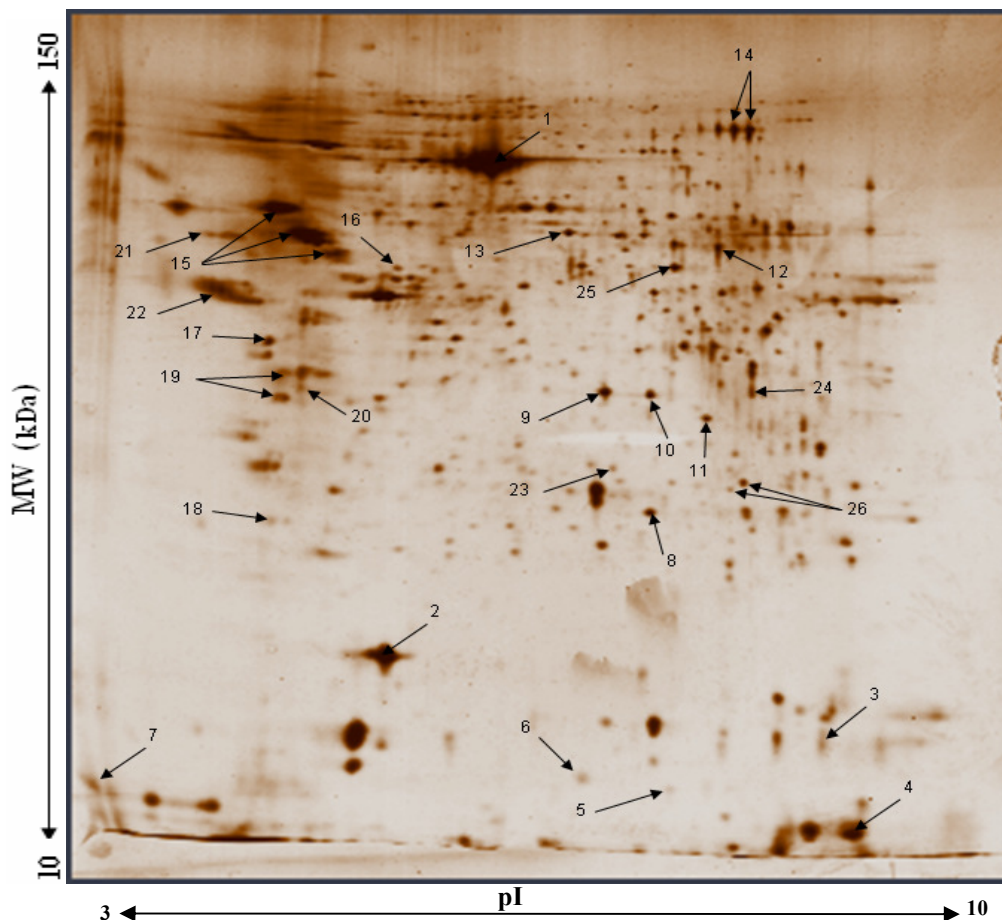


Figura 18: Gel de 2DE da fracção citoplasmática de parótida revelado com prata.

A partir do gel 2DE corado com coomassie coloidal, cortaram-se 110 *spots*, tendo-se conseguido obter identificação de 33 *spots* que correspondem a 26 proteínas diferentes (Anexo II).

O conjunto de proteínas da fracção citoplasmática de parótida identificadas foi agrupado segundo a sua função. As classes proteicas mais representativas foram as relativas à reparação de proteínas (25%), metabolismo (21%) e transporte (21%), seguidas pelas classes sinalização (9%), degradação proteica (9%), estrutural/citoesqueleto (6%) e oxidação/redução (3%) como se apresenta no gráfico seguinte:

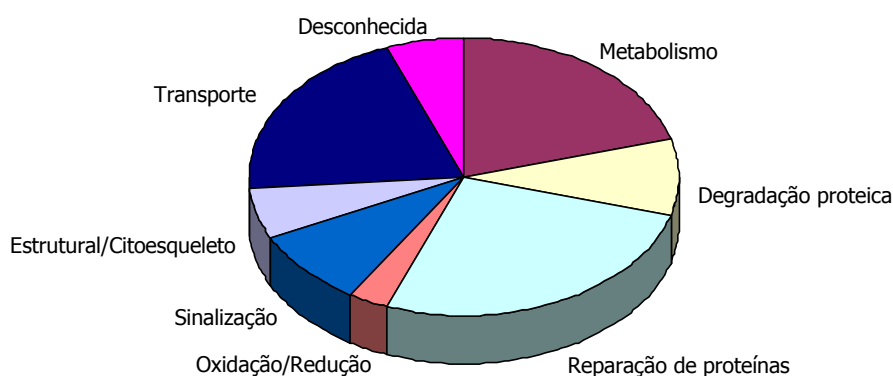


Figura 19: Distribuição das proteínas identificadas na fracção citoplasmática de parótida segundo a sua função.

3.1.2- Fracção nuclear

Nos géis 2DE da fracção nuclear de parótida, após revelação com prata, observaram-se 646 ± 77 *spots*. Nestes géis não se observaram diferenças de distribuição dos *spots* nem em relação ao peso molecular nem em relação ao ponto isoeléctrico das proteínas (Anexo III).

A partir do gel 2DE corado com coomassie coloidal, cortaram-se 370 *spots*, tendo-se conseguido obter identificação de 106 *spots* que correspondem a 95 proteínas diferentes (Anexo IV).

O conjunto de proteínas da fracção nuclear de parótida identificadas foi agrupado segundo a sua função. As classes proteicas mais representativas foram as relativas ao metabolismo (29%), degradação proteica (19%) e sinalização (15%), seguidas pelas classes relativas ao transporte (10%) oxidação/redução (9%), estrutural/citoesqueleto (8%), modificação/ligação RNA (6%) e reparação de proteínas (3%), como se apresenta no gráfico seguinte:

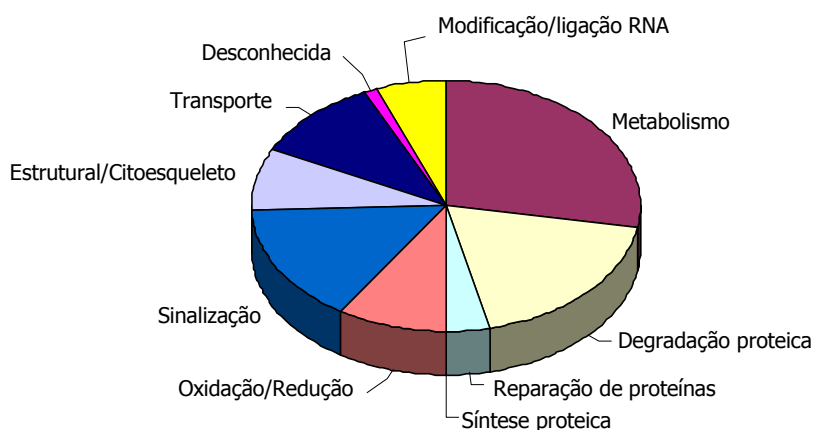


Figura 20: Distribuição das proteínas identificadas na fracção nuclear de parótida segundo a sua função.

3.1.3- Células acinares de parótida

A observação ao microscópio óptico das células acinares da parótida, permitiu-nos observar que as células se encontravam em agregados celulares e que apresentavam diferentes dimensões. As células observadas pareciam estar bem conservadas, encontrando-se na generalidade a membrana plasmática íntegra e a presença de granulações de diferentes tamanhos.

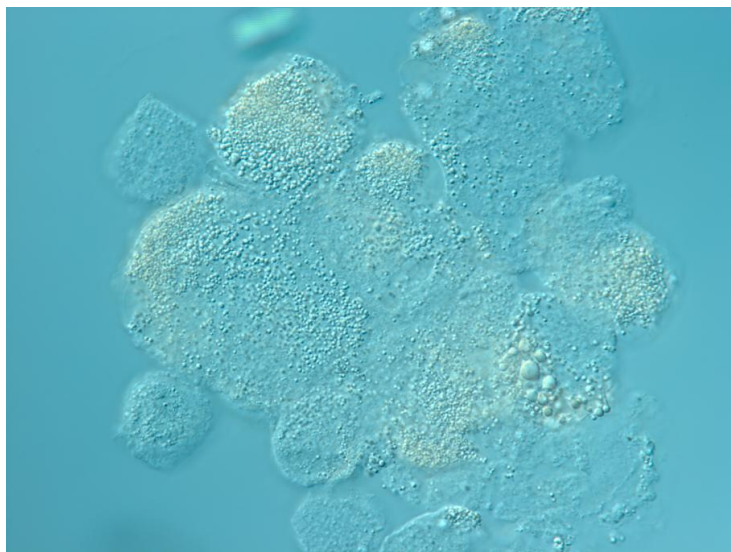


Figura 21: Fotografia de microscopia óptica das células acinares de parótida (x 400).

Nos géis 2DE da fracção citoplasmática das células acinares de parótida, após revelação com prata, observaram-se 153 ± 23 *spots*. Estes géis apresentavam os *spots* mais intensos na zona correspondente a proteínas básicas de peso molecular entre 30-80 kDa (Anexo V).

A partir do gel 2DE corado com coomassie coloidal, cortaram-se 107 *spots*, tendo-se conseguido obter identificação de 18 *spots* que correspondem a 13 proteínas diferentes (Anexo VI).

O conjunto de proteínas da fracção citoplasmática das células acinares de parótida identificadas foi agrupado segundo a sua função. As classes proteicas presentes foram as relativas ao metabolismo (39%), transporte (33%), degradação proteica (22%) e reparação de proteínas (6%):

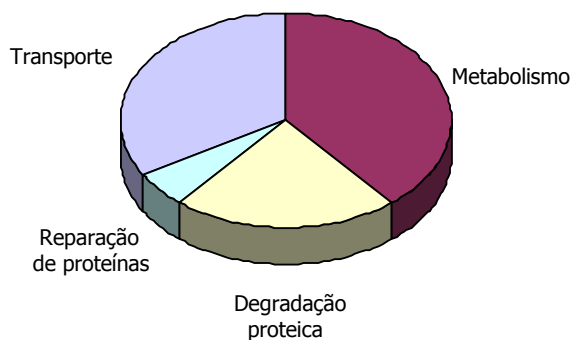


Figura 22: Distribuição das proteínas identificadas na fracção citoplasmática das células acinares de parótida segundo a sua função.

3.1.4- Grânulos secretores de parótida

A observação por microscopia electrónica de transmissão da fracção isolada de grânulos secretores da parótida possibilitou a verificação da sua composição. A presença na fracção em estudo de uma percentagem significativa de grânulos secretores, sendo a contaminação com mitocôndrias de cerca de 15-20%, leva-nos a considerar esta fracção uma fracção enriquecida de grânulos secretores da parótida. Os grânulos observados apresentavam dimensões diversas e uma matriz diferente de acordo com a dimensão dos próprios grânulos.

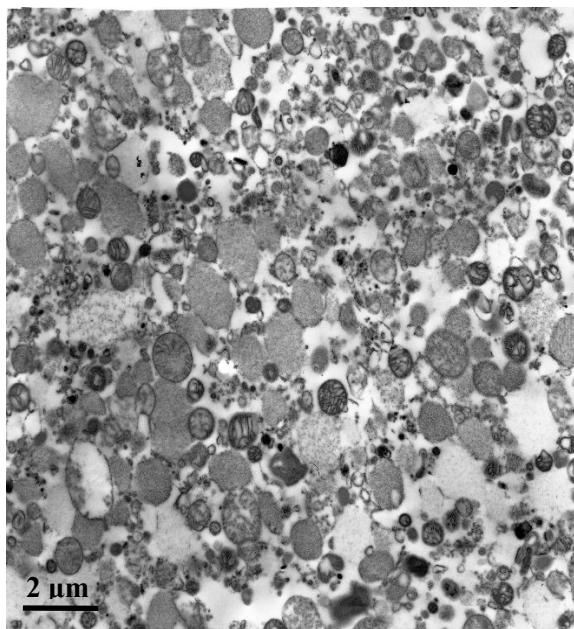


Figura 23: Fotografia de microscopia electrónica de transmissão de uma fracção enriquecida de grânulos secretores de parótida.

Nos géis 2DE de grânulos secretores de parótida, após revelação com prata, observaram-se 188 ± 25 *spots*. Estes géis apresentavam 130 ± 16 *spots* na zona correspondente a proteínas de peso molecular entre 30-80 kDa. Comparativamente, os géis apresentavam mais *spots* correspondentes a proteínas básicas do que a ácidas (Anexo VII).

A partir do gel 2DE corado com coomassie coloidal, cortaram-se 84 *spots*, tendo-se conseguido obter identificação de 27 *spots* que correspondem a 21 proteínas diferentes (Anexo VIII).

O conjunto de proteínas dos grânulos secretores de parótida identificadas foi agrupado segundo a sua função. As classes proteicas mais representativas foram as relativas à degradação proteica (35%) e metabolismo (26%), seguidas pelas classes relativas ao transporte (13%), estrutural/citoesqueleto (10%), sinalização (10%), oxidação/redução (3%) e reparação de proteínas (3%), como se apresenta no gráfico seguinte:

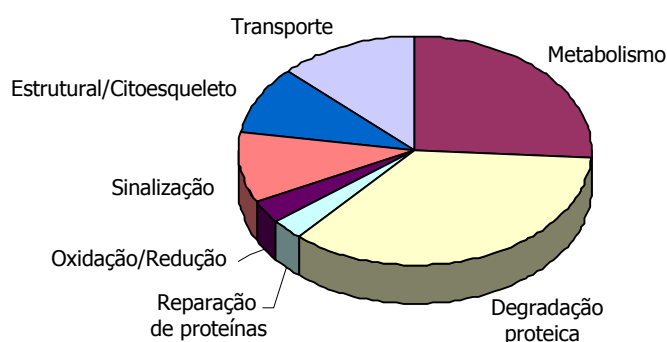


Figura 24: Distribuição das proteínas identificadas nos grânulos secretores de parótida segundo a sua função.

As fracções dos digestos trípticos de péptidos de grânulos secretores de parótida, separadas por nano-HPLC, foram analisadas no espectrómetro de massa MALDI-TOF/TOF, tendo sido identificados 52 péptidos pertencentes a 17 proteínas diferentes, como se apresenta na tabela seguinte:

Nome da proteína	Número de acesso	MW	Nº de péptidos identificados
Salivary acidic proline-rich phosphoprotein 1/2 precursor (PRP-1/PRP-3)	P02810	17006	13
Basic salivary proline-rich protein 1 precursor (Salivary proline-rich protein)	P04280	38523	5
Proline-rich protein 3 precursor (Proline-rich peptide P-B)	P02814	8182	5
Basic salivary proline-rich protein 3 precursor (Parotid salivary glycoprotein G1)	Q04118	30918	4
Lysozyme C precursor	P61626	16526	3
Histatin 1 precursor	P15515	6958	3
Salivary protein 1	P02815	14888	3
Statherin precursor	P02808	7300	3
Zinc finger protein 64, isoforms 1 and 2	Q9NPA5	74623	2
Transmembrane protease serin 5	Q9ER04	49600	2
78 kDa glucose-regulated protein precursor (Immunoglobulin heavy chain binding protein)	P06761	74623	2
Cystatin SN precursor (Salivary cystatin SA-1)	P01037	16351	2
Calreticulin prec (Calregulin)	Q8K3H7	48213	1
Matrix metalloproteinase-19 prec (MMP-19)	Q99542	57321	1
Ras GTPase-activating-like protein	Q13576	180369	1
Peroxisomal multifunctional enzyme type 2	P51660	79474	1
Cytochrome c oxidase polypeptide Vb	P19536	13804	1

Tabela 3: Proteínas e número de péptidos identificados nos digestos tripticos de péptidos dos grânulos secretores de parótida.

3.2- Fraccionamento da glândula submandibular

3.2.1- Fracção citoplasmática

Nos géis 2DE da fracção citoplasmática de submandibular, após revelação com prata, observaram-se 332 ± 43 spots. Estes géis apresentam spots ao longo de toda a gama de pesos moleculares e pontos isoeléctricos em estudo, salientando-se a presença de vários spots de grande intensidade na zona correspondente a proteínas de peso molecular entre 15-50 kDa.

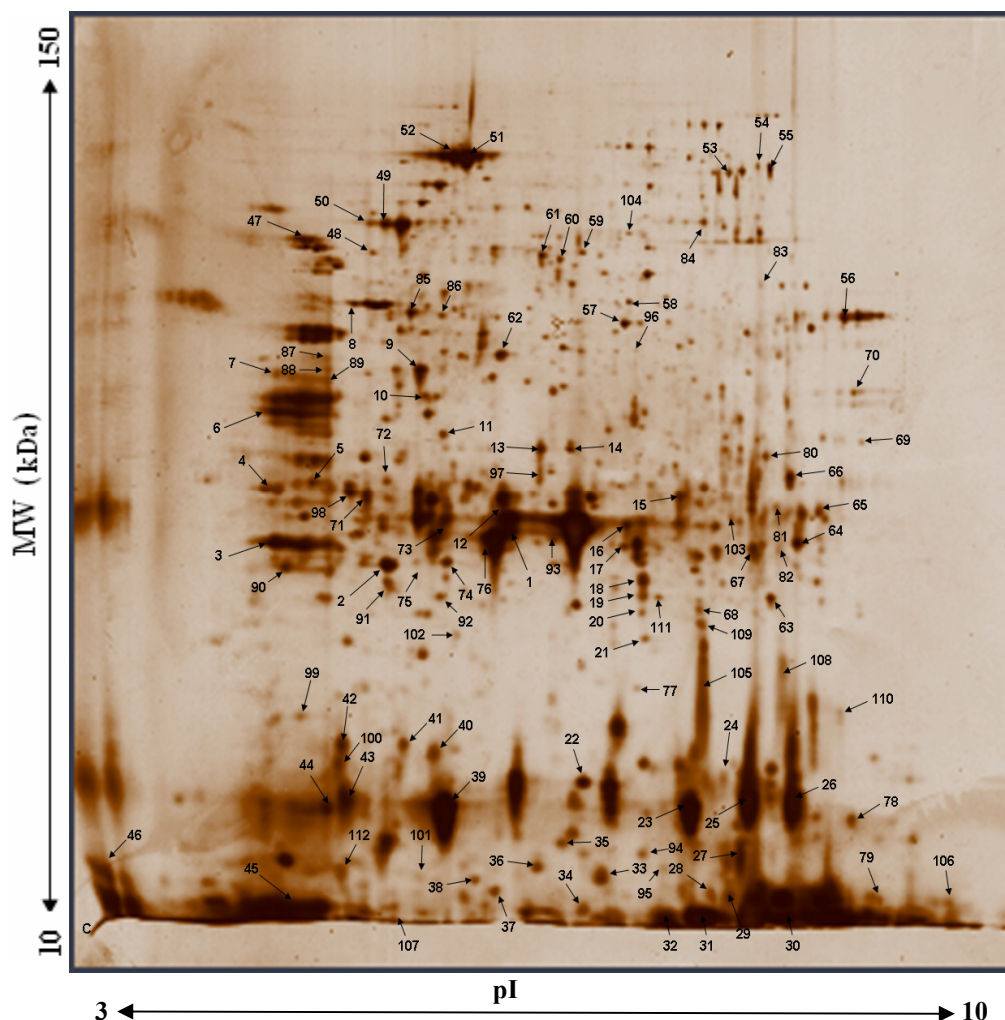


Figura 25: Gel 2DE da fracção citoplasmática de submandibular revelado com prata.

A partir do gel 2DE corado com coomassie coloidal, cortaram-se 242 *spots*, tendo-se conseguido obter identificação de 112 *spots* que correspondem a 45 proteínas diferentes (Anexo X).

O conjunto de proteínas identificadas na fracção citoplasmática de submandibular foi agrupado segundo a sua função. As classes proteicas mais representativas foram as relativas à degradação proteica (40%), transporte (23%) e metabolismo (14%), seguidas pelas classes reparação de proteínas (9%), oxidação/redução (5%), sinalização (3%), estrutural/citoesqueleto (2%), defesa/resposta imune (2%) e síntese proteica (1%), como se apresenta no gráfico seguinte:

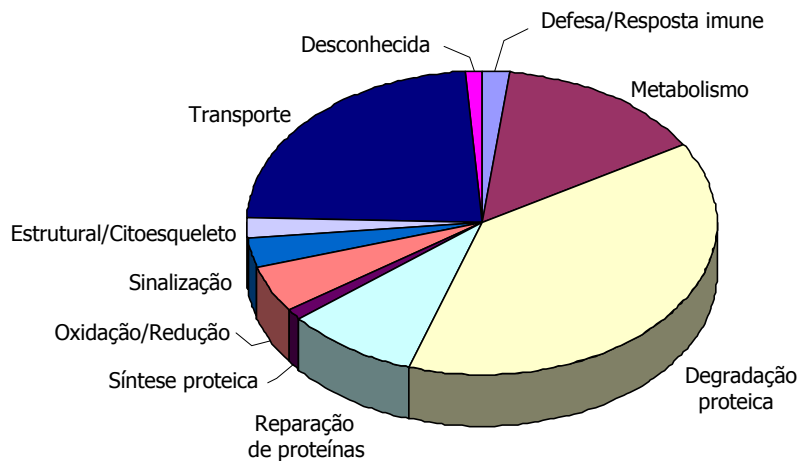


Figura 26: Distribuição das proteínas identificadas na fracção citoplasmática de submandibular segundo a sua função.

3.2.2- Fracção nuclear

Nos géis 2DE da fracção nuclear de submandibular, após revelação com prata, observam-se cerca de 595 ± 81 *spots*. Os *spots* presentes distribuíam-se ao longo de todo o gel, encontrando-se vários *spots* de grande intensidade na zona correspondente a proteínas de peso molecular entre 15-60 kDa (Anexo XI).

A partir do gel 2DE corado com coomassie coloidal, cortaram-se 224 *spots*, tendo-se conseguido obter identificação de 106 *spots* que correspondem a 57 proteínas diferentes (Anexo XII).

O conjunto de proteínas identificadas na fracção nuclear de submandibular foi agrupado segundo a sua função. As classes proteicas mais representativas foram as relativas à degradação proteica (45%), estrutural/citoesqueleto (23%) e metabolismo (17%), seguidas pelas classes relativas ao transporte (8%), sinalização (3%), oxidação/redução (2%) e reparação de proteínas (2%), como se apresenta no gráfico seguinte:

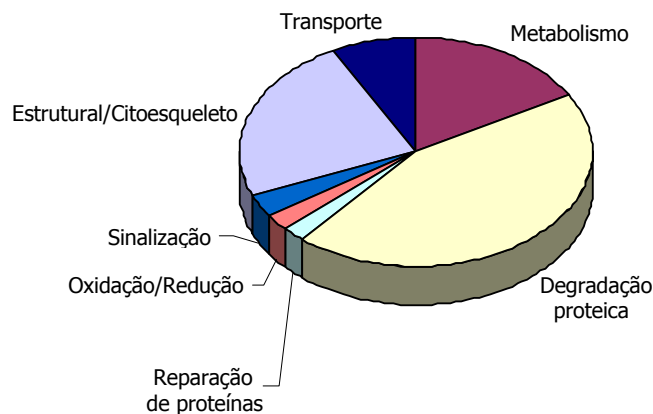


Figura 27: Distribuição das proteínas identificadas na fracção nuclear de submandibular segundo a sua função.

3.2.3- Células acinares de submandibular

A observação ao microscópio óptico das células acinares da submandibular, permitiu-nos observar que as células se encontravam no geral agrupadas duas a duas, apresentando uma forma irregular. As células observadas apresentavam granulações dispersas por toda a célula.

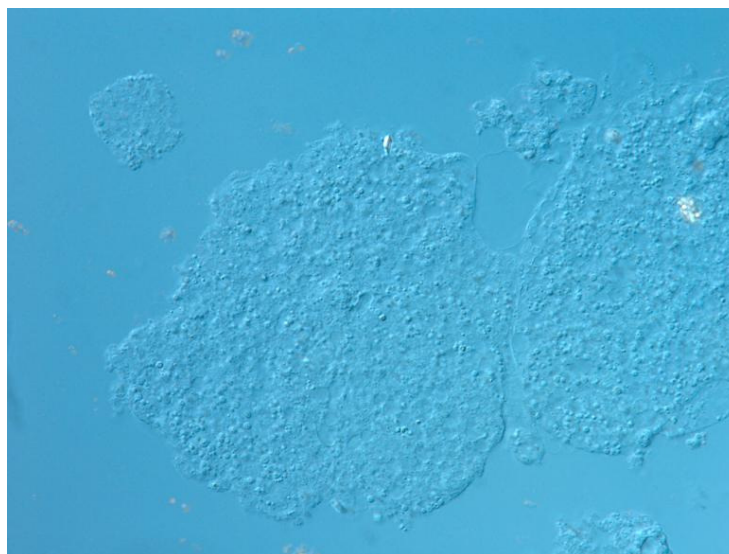


Figura 28: Fotografia de microscopia óptica das células acinares de submandibular (x 400).

Nos géis 2DE da fracção citoplasmática das células acinares de submandibular, após revelação com prata, observaram-se 231 ± 32 *spots*. Estes géis apresentavam 140 ± 17 *spots* correspondentes a proteínas de peso molecular entre 30-90 kDa, não se observando diferenças significativas relativamente à distribuição das proteínas ácidas ou básicas (Anexo XIII).

A partir do gel 2DE corado com coomassie coloidal, cortaram-se 117 *spots*, tendo-se conseguido obter identificação de 35 *spots* que correspondem a 27 proteínas diferentes (Anexo XIV)

O conjunto de proteínas identificadas na fracção citoplasmática das células acinares de submandibular foi agrupado segundo a sua função. As classes proteicas mais representativas foram as relativas à degradação proteica (36%), metabolismo (19%) e transporte (14%), seguidas pelas classes relativas à reparação de proteínas (11%), defesa/resposta imune (8%), sinalização (3%), oxidação/redução (3%), síntese proteica (3%) e estrutural/citoesqueleto (3%) como se apresenta no gráfico seguinte:

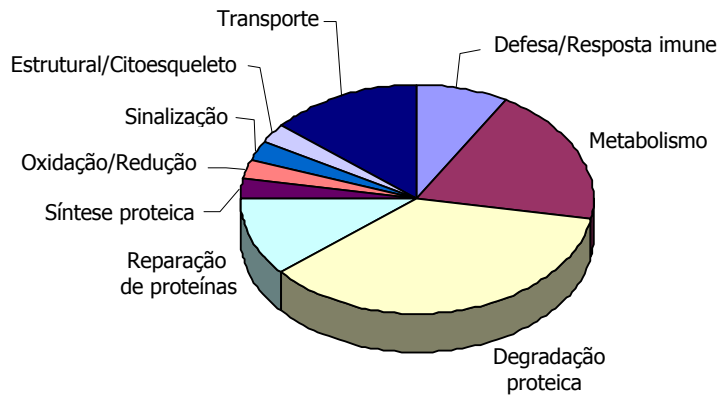


Figura 29: Distribuição das proteínas identificadas na fração citoplasmática das células acinares de submandibular segundo a sua função.

3.2.4- Grânulos secretores de submandibular

A observação por microscopia electrónica de transmissão da fracção isolada de grânulos secretores da submandibular possibilitou a verificação da sua composição. Nesta fracção encontraram-se grânulos de várias dimensões, que constituem essencialmente esta fracção. No entanto, observou-se a contaminação com mitocôndrias, cerca de 15-20%. Nesta fracção observaram-se também alguns fragmentos de membrana celular e detritos.

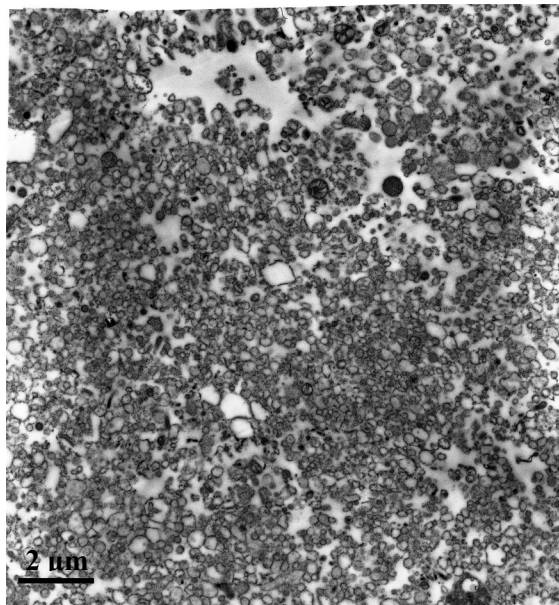


Figura 30: Fotografia de microscopia electrónica de transmissão da fracção enriquecida de grânulos secretores de submandibular.

Nos géis 2DE da fracção citoplasmática das células acinares de submandibular, após revelação com prata, observaram-se cerca de 256 ± 38 spots. Estes géis apresentavam aproximadamente 180 ± 23 spots na zona correspondente a proteínas de peso molecular entre 30-90 kDa, destacando-se ligeiramente a zona correspondente às proteínas básicas (Anexo XV).

A partir do gel 2DE corado com coomassie coloidal, cortaram-se 142 spots, tendo-se conseguido obter identificação de 70 spots que correspondem a 34 proteínas diferentes (Anexo XVI).

O conjunto de proteínas identificadas nos grânulos secretores de submandibular foi agrupado segundo a sua função. As classes proteicas mais representativas foram as relativas à degradação proteica (58%), metabolismo (10%) e reparação de proteínas (10%), seguidas pelas classes relativas ao transporte (7%), oxidação/redução (7%), estrutural/citoesqueleto (7%) e síntese proteica (1%) como se apresenta no gráfico seguinte:

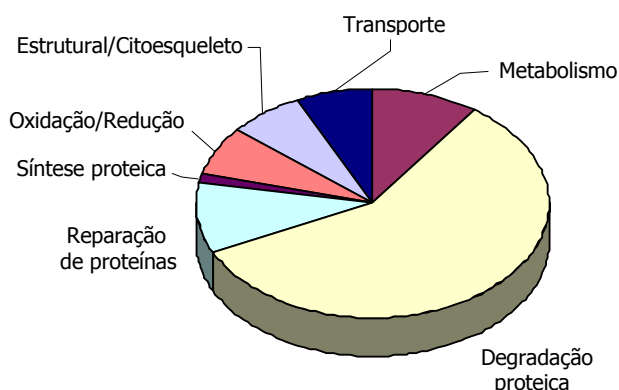


Figura 31: Distribuição das proteínas identificadas nos grânulos secretores de submandibular segundo a sua função.

As fracções dos digestos trípticos de péptidos de grânulos secretores de submandibular, separadas por nano-HPLC, foram analisadas no espectrómetro de massa MALDI-TOF/TOF, tendo sido identificados 255 péptidos pertencentes a 19 proteínas diferentes, como se apresenta na tabela seguinte:

Nome da proteína	Número de acesso	MW	Nº de péptidos identificados
Glandular kallikrein K9 prec (mGK-9)	P15949	28882	34
Glandular kallikrein K13 prec (mGK-13)	P36368	28671	24
Glandular kallikrein K1 prec (mGK-1)	P00755	29003	22
Glandular kallikrein K27 prec (mGK-27)	Q9JM71	28724	21
Glandular kallikrein K3 prec (mGK-3)	P00756	28979	19
Glandular kallikrein K11 prec (mGK-11)	P15946	28708	18
Glandular kallikrein K8 prec (mGK-8)	P07628	28513	18
Glandular kallikrein K24 prec (mGK-24)	Q61754	28908	17
Glandular kallikrein K22 prec (mGK-22)	P15948	28365	14
Glandular kallikrein K21 prec (mGK-21)	Q61759	28671	10
Renin 2 prec (Submandibular gland rennin)	P00796	44254	10
Glandular kallikrein K5 prec (mGK-5)	P15945	28729	8
Protein disulfide-isomerase A3 prec	P27773	56586	8
Gamma- rennin, submandibular gland prec (mGK-16)	P04071	28703	7
Calreticulin (Calregulin)	P18418	47966	7
Serum albumin prec	P08003	68648	6
Protein disulfide-isomerase prec	P09103	57108	5
Protein disulfide-isomerase A4 prec	P08003	71929	4
Glandular kallikrein K7 submandibular prec	P36373	28953	3

Tabela 4: Proteínas e número de péptidos identificados nos digestos trípticos dos grânulos secretores de submandibular.

3.3- Glândula parótida versus glândula submandibular

Ao observarmos os géis de 2DE das diferentes fracções de ambas as glândulas em estudo, verificamos que apresentam perfis proteicos perfeitamente distintos. Apresentando-se no caso da parótida a fracção nuclear como a fracção mais complexa, com cerca de 646 ± 77 spots, seguida das fracções citoplasmática, grânulos secretores e citoplasma de células acinares com cerca de 195 ± 27 , 188 ± 25 e 153 ± 23 spots respectivamente. No caso da submandibular, também a fracção nuclear foi a que apresentou um perfil proteico mais complexo, com cerca de 595 ± 81 spots, seguida da citoplasmática com 332 ± 43 spots. A fracção subcelular de grânulos secretores e de citoplasma de células acinares apresentaram 256 ± 38 e 231 ± 32 spots respectivamente.

Comparando os perfis de 2DE das fracções de grânulos secretores de parótida e de submandibular, observou-se um padrão similar na zona de baixo peso molecular. Contudo, o perfil 2DE dos grânulos secretores de parótida apresentou um incremento de 22% no número de proteínas básicas, enquanto que os grânulos secretores de submandibular apresentaram um incremento no número de proteínas ácidas de 9%.

Outras das fracções onde se consegue facilmente observar diferenças nos perfis dos géis 2DE são as citoplasmáticas. As glândulas parótida e submandibular apresentam os spots de maior intensidade nas zonas correspondentes a proteínas de 40-90 e 15-50 kDa, respectivamente.

As fracções nucleares também apresentam diferenças notórias, encontrando-se na fracção nuclear de parótida spots correspondentes a proteínas com um peso molecular de 15-120 kDa, enquanto que a submandibular apresenta a quase totalidade dos spots em zonas correspondentes a massas moleculares inferiores a 90 kDa.

Relativamente às fracções de citoplasma de células acinares e dos grânulos secretores, estas apresentam perfis proteicos similares em ambas as glândulas.

Após a classificação das proteínas identificadas nas diferentes fracções, verificou-se que existem diferenças na localização subcelular das diversas classes de proteínas. Por exemplo, se efectuarmos a comparação entre as classes de proteínas identificadas na fracção citoplasmática e na nuclear de parótida, verifica-se que a fracção citoplasmática apresenta uma percentagem maior de proteínas envolvidas na reparação proteica e no transporte. No entanto, apresenta uma menor percentagem de proteínas relacionadas com

sinalização, estrutura/citoesqueleto e oxidação/redução que a fracção nuclear. A fracção nuclear de parótida apresenta ainda em exclusivo proteínas de ligação e modificação do RNA.

Comparativamente, nas fracções de submandibular também se observam distribuições diferentes das várias classes de proteínas. Dentro destas fracções, por exemplo, a fracção nuclear é aquela que apresenta uma maior percentagem de proteínas com funções estruturais/citoesqueleto e a menor percentagem de proteínas envolvidas na reparação proteica.

Em ambas as glândulas salivares a classe relativa à degradação proteica encontrava-se bem representada. Na submandibular, esta classe de proteínas foi em todas as fracções a mais representativa, com percentagens de 36-58%.

Após a identificação das proteínas presentes nas diferentes fracções de glândula parótida, verificou-se que o citoplasma de parótida não apresentou caliceínas, a fracção nuclear apresentou unicamente o precursor da caliceína glandular mK22, também designado por *epidermal growth factor-binding protein type A*. A fracção correspondente ao citoplasma das células acinares apresentou o precursor da caliceína glandular mK9 ou *epidermal growth factor-binding protein type C*. Relativamente aos grânulos secretores de parótida, esta fracção apresentou vários precursores de caliceínas glandulares, designadamente da mK8, mK9, mK16 (*gamma-renin submandibular gland precursor*) e o mK26 (*prorenin-converting enzyme 2*).

Relativamente à glândula submandibular, verificou-se que apresenta uma grande variedade de caliceínas nas várias fracções subcelulares. Na fracção citoplasmática encontraram-se vários precursores de caliceínas glandulares, nomeadamente da mK5, mK8, mK9, mK11, mK13, mK22, mK26, mK27 e o mK16. A fracção nuclear apresentou os precursores das caliceínas glandulares seguintes: mK1, mK5, mK8, mK9, mK16, mK22, mK26 e mK27. A fracção correspondente ao citoplasma das células acinares de submandibular apresentou os precursores das caliceínas glandulares mK8, mK9, mK13 e mK26. Quanto aos grânulos secretores da glândula submandibular, esta fracção apresentou os precursores das caliceínas glandulares mK5, mK6, mK8, mK9, mK11, mK13, mK16, mK22 e mK26.

Comparando as fracções de parótida e submandibular estudadas, verifica-se que a submandibular apresenta um maior número de caliceínas expressas em todas as fracções, como se observa no gráfico seguinte:

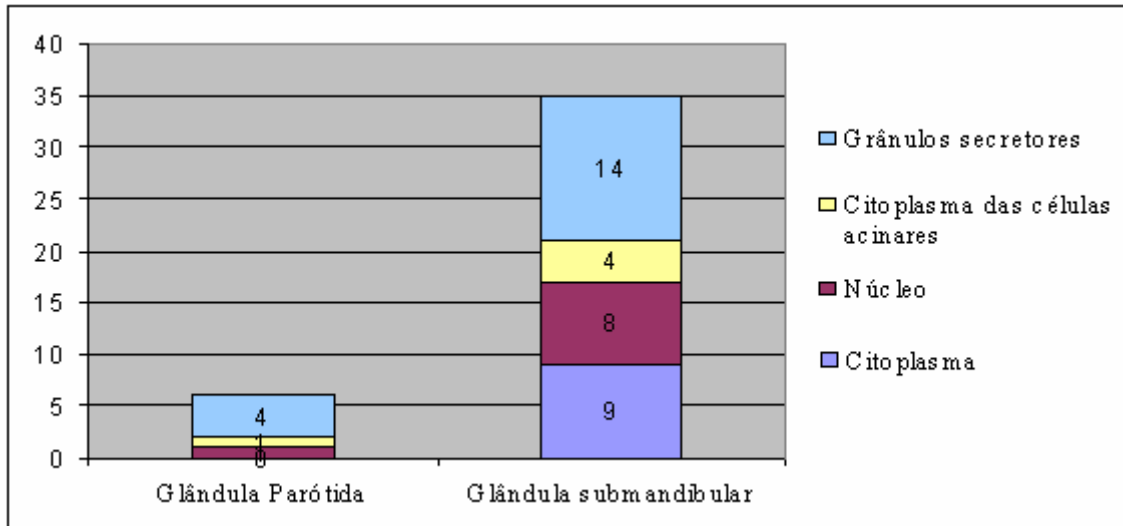


Figura 32: Número de caliceínas diferentes identificadas nas fracções das glândulas parótida e submandibular por 2DE-MALDI-TOF/TOF e nano-HPLC-MALDI-TOF/TOF.

Apresentando a glândula submandibular a maior variedade de caliceínas, o gráfico seguinte apresenta de forma quantitativa as diferentes caliceínas presentes nas fracções: citoplasmática, citoplasma das células acinares e grânulos secretores analisados por 2DE.

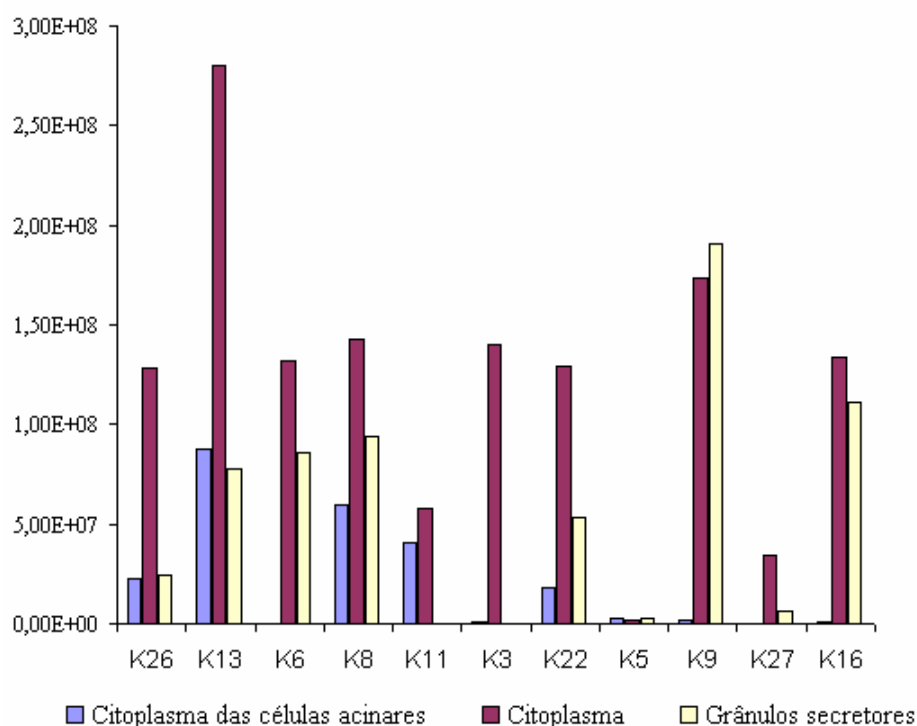


Figura 33: Distribuição quantitativa das diferentes caliceínas identificadas nas frações da glândula submandibular.

Após a análise do gráfico podemos observar que as diferentes caliceínas se encontram em diferentes quantidades nas diversas frações. A fração citoplasmática é a fração que apresenta maiores quantidades de caliceínas e dentro desta a caliceína mK13 é a que se encontra em maior quantidade. Esta proteína caracteriza-se por converter a renina 2, uma espécie de pró-renina que também se encontrou nesta fração da submandibular, em renina matura. Nos grânulos secretores a caliceína que se encontrava presente em maior quantidade era a mK9. A fração citoplasmática das células acinares apresentou como caliceína mais abundante a mK13.

O conjunto de proteínas identificadas pela análise dos digestos trípticos de péptidos dos grânulos secretores de parótida estão de acordo com as presentes na saliva. Nesta abordagem conseguiram-se identificar várias proteínas de baixo peso molecular, que não se conseguiram identificar utilizando 2DE, como algumas proteínas-ricas em prolina (*Salivary acidic proline-rich phosphoprotein 1/2 precursor*; *Proline-rich protein 3 precursor*; *Basic salivary proline-rich protein 3 precursor*; *Basic salivary proline-rich protein 1 precursor*), *Lysozyme C precursor*, *Histatin 1 precursor*, *Salivary protein 1*, *Statherin precursor*, *Cystatin SN precursor*.

Relativamente ao conjunto de proteínas identificadas nos digestos trípticos dos grânulos secretores de submandibular, apresentavam uma grande variedade de calicreínas, tal como as fracções analisadas por 2DE.

4- DISCUSSÃO

Cascieri *et al.* (1983), utilizando 2DE e a coloração com prata, observaram 122 polipeptídeos com peso moleculares de 11000 a 138000 Da e pontos isoelétricos de 4.8 a 6.55 no conteúdo proteico dos grânulos secretores de parótida de rato. Neste trabalho, no gel 2DE de grânulos secretores de parótida de ratinho, após revelação com prata, conseguimos observar cerca de 150 *spots*, correspondendo a polipeptídeos com pesos moleculares de 10 kDa a 150 kDa e pontos isoelétricos de 3 a 10.

Não se conhecem outros estudos semelhantes que envolvam a análise de fracções subcelulares de parótida e submandibular, facto que limita esta discussão. Note-se a necessidade de continuação do desenvolvimento de trabalhos nesta área que permitam aprofundar o conhecimento das glândulas salivares.

Neste trabalho efectuou-se o fraccionamento subcelular das células de parótida e submandibular. O largo intervalo dinâmico da abundância de proteínas, que pode variar de cerca de 10^6 para as células até 10^{10} para os tecidos em proteomas complexos, com propriedades químicas e físicas diferentes, continuam a desafiar a investigação em proteómica (Drahos *et al.*, 2005). Devido ao poder de resolução limitado das técnicas de separação analítica aplicadas presentemente na análise da expressão proteica, as estratégias de pré-fraccionamento são necessárias para reduzir a complexidade da amostra. Neste trabalho a estratégia de análise do proteoma subcelular é uma forma de complementar o poder separativo da 2DE e da nano-HPLC.

A redução da complexidade da amostra aumenta o número de proteínas menos abundantes que podem ser analisadas subsequentemente, reduzindo o número de proteínas mascaradas pelas mais abundantes, como por exemplo proteínas estruturais e *housekeeping*. As proteínas reguladoras presentes em baixo número como as cinases, fosfatases ou GTPases, apenas conseguem ser detectadas após a aplicação de técnicas fraccionamento (Stasyk & Huber, 2004; Huber *et al.*, 2003). No nosso trabalho encontram-se algumas proteínas deste tipo, no entanto, a presença de proteínas em grande quantidade como por exemplo a precursora da albumina sérica e as várias caliceínas dificultam a identificação de proteínas menos abundantes. A utilização de metodologias de remoção selectiva destas proteínas poderá contribuir para melhorar o conhecimento do proteoma das glândulas salivares.

O fraccionamento subcelular apresenta vantagens como o aumento do número de proteínas identificadas e a sua localização subcelular (Abdolzade-Bavil *et al.*, 2004). Neste trabalho o fraccionamento subcelular foi efectuado através de centrifugação diferencial, isolamento de células acinares e de grânulos secretores.

Relativamente à centrifugação diferencial permitiu-nos separar as amostras de homogeneizado de tecido glandular em duas fracções. Sendo as células glandulares essencialmente especializadas na secreção, apresentam um citoplasma bastante desenvolvido. Através da centrifugação obtivemos uma fracção contendo sobretudo proteínas citosólicas e outra contendo proteínas do citoesqueleto, membranares, organelares e principalmente nucleares. A identificação das proteínas presentes nestas fracções confirmou os dados anteriores.

O isolamento de células acinares foi outro dos procedimentos de redução de complexidade da amostra e de localização celular das proteínas analisadas. As glândulas salivares são constituídas em cerca de 90% por células acinares, sendo as restantes células dos ductos, que também apresentam uma actividade secretora. O isolamento das células acinares permite-nos identificar proteínas relativas unicamente a este tipo de células e pesquisar possíveis proteínas produzidas pelas células dos ductos.

O isolamento dos grânulos secretores foi mais uma etapa no fraccionamento subcelular das glândulas salivares, permitindo um estudo específico das proteínas presentes nestes organelos celulares, de vital importância no processo de exocitose.

Quanto às técnicas separativas, neste trabalho executaram-se duas abordagens diferentes, a cromatografia líquida, mais propriamente nano-HPLC e a 2DE. Também este facto contribui para melhorar a capacidade de separação das diferentes proteínas presentes nas glândulas, aliando à grande capacidade de resolução e reprodutibilidade da 2DE, a capacidade da LC na separação de digestos trípticos, permitindo a identificação de péptidos e proteínas pequenas não visualizadas nos géis de 2DE. A 2DE permite também separar formas proteicas que tenham sofrido modificações pós-traducionais. As técnicas de LC apresentam ainda as vantagens de não induzirem modificações nos resíduos proteicos e possibilitarem a identificação de modificações pós-traducionais através de LC-MALDI-TOF/TOF. No entanto, a 2DE continua a ser a única técnica aplicada de forma rotineira na comparação quantitativa de conjuntos complexos de proteínas como homogeneizados

celulares, permitindo obter informações como o pI, MW, solubilidade e abundância relativa das proteínas.

Na análise da composição proteica por 2DE das diferentes fracções de glândula parótida encontramos 125 proteínas diferentes. Relativamente à glândula submandibular, nas diferentes fracções estudadas identificámos 100 proteínas diferentes. Após a comparação das diferentes proteínas identificadas entre as diversas fracções das duas glândulas, verificámos que a glândula parótida apresentou 73,6% de proteínas exclusivas desta glândula, enquanto a submandibular apresentou 67% de proteínas em exclusivo. Estes resultados estão de acordo com resultados obtidos por Walz *et al.* (2006), no estudo das salivas produzidas pelas diferentes glândulas, nos quais também se observa a presença de proteínas exclusivas de cada glândula.

Através da análise dos digestos trípticos dos grânulos secretores por nano-HPLC-MALDI-TOF/TOF, conseguimos identificar 19 proteínas na fracção dos grânulos secretores de submandibular e 17 proteínas na fracção de grânulos secretores de parótida. A utilização desta abordagem complementou a análise por 2DE-MALDI-TOF/TOF e permitiu identificar mais 14 proteínas diferentes referentes à parótida e 5 proteínas diferentes referentes à submandibular.

Devemos de ter em consideração que a diversidade proteica nestas glândulas deve ser substancialmente maior devido ao facto de não termos conseguido a identificação de vários *spots* e à possibilidade de se encontrarem misturadas várias proteínas ou estarem sobrepostas por outras no gel de 2DE. Factores como os limites de detecção do corante também podem conduzir que algumas proteínas não sejam observadas.

Na composição proteica da glândula parótida, encontramos várias proteínas presentes na saliva produzida por esta glândula como a anidrase carbónica, albumina, alfa-amilase e transferrina, o que está de acordo com o descrito por Walz *et al.* (2006).

Na análise da composição proteica da glândula submandibular, encontramos substâncias bioactivas, como factores de crescimento (*NGF*, *EGF*), renina e várias calicreínas tecidulares, também já descritas por Yamato Kikkawa *et al.* (1998). Nesta glândula identificámos também as proteínas PSP, alfa-amilase, anidrase carbónica e albumina presentes na saliva da glândula submandibular, segundo o trabalho de Walz *et al.* (2006).

Ambas as glândulas salivares, parótida e submandibular, apresentaram caliceínas. O termo caliceína (*kallikrein*) foi introduzido por Werle *et al.* (1930), que encontraram níveis altos desta proteína no pâncreas, em grego “Kallikreas”. As caliceínas são expressas em vários tecidos e fluidos biológicos, incluindo as glândulas salivares, tecidos endócrinos e sistema nervoso central dentre outros. As caliceínas são proteases serínicas que apresentam diversas funções fisiológicas (Yousef & Diamandis, 2001).

Tal como na família das caliceínas expressas no homem, das caliceínas expressas em ratinho, apenas uma caliceína, *mouse kalikrein K1*, apresenta verdadeira actividade de cininogenase. As restantes caliceínas apresentam diferentes tipos de actividade: as caliceínas mK3 e mK4 são proteínas de ligação e enzimas de processamento do factor de crescimento nervoso, as caliceínas mK9, mK13 e mK22 são proteínas de ligação ao factor de crescimento epidérmico, a caliceína mK22 é uma enzima de inactivação do factor de crescimento neural e as caliceínas mK16 e mK26 são enzimas conversoras da renina e da pró-renina respectivamente (Kikkawa *et al.*, 1998).

Algumas caliceínas como a mK16, mK3, mK6, mK27 e mK9 encontram-se na fracção citoplasmática da glândula submandibular, mas praticamente não existem na fracção citoplasmática das células acinares. Estes resultados podem dever-se à contribuição das células do ducto que expressam vários tipos de caliceínas.

Segundo Yamato Kikkawa *et al.* (1998), a caliceína tecidular mK1, a qual apresenta a mais alta actividade de cininogenase, exibe a menor actividade de conversão da pró-renina em renina. Pelo contrário a caliceína mK13 apresenta a menor actividade de cininogenase e uma actividade notável na conversão da pró-renina em renina. Este facto é interessante e compreensível, porque as duas actividades conduzem à formação de cinina ou angiotensina, que apresentam efeitos opostos na regulação da pressão sanguínea. A presença de proteínas como a mK13, com a capacidade de formação de renina, podem deixar antever alguma importância das glândulas salivares, principalmente a submandibular, no sistema renina-angiotensina.

Oikonomopoulou *et al.* (2006) apontam as caliceínas como importantes reguladores “hormonais” das funções tecidulares, muito provavelmente actuando em parte via receptores activados por proteases (PARs). A autora adiciona os PARs à lista de alvos das caliceínas, o que pode explicar as propriedades de sinalização que esta família de enzimas apresenta em vários tecidos. Através da activação dos PARs, as caliceínas podem

potenciar o sinal através de várias vias de transdução de sinal associadas a proteínas G, regulando processos desde a migração celular, inflamação, angiogénese tumoral, crescimento e metastização. No entanto, os efeitos que as calicreínas possam ter em alguma situação devem depender do espectro de calicreínas presentes e da disponibilidade de PARs, que podem ser expressos em qualquer tecido específico (Oikonomopoulou *et al.*, 2006; Macfarlane *et al.*, 2001). Dado o alargado leque de calicreínas presentes nas glândulas salivares, seria importante um estudo exaustivo destas proteases, na tentativa de especificar as funções que desempenham nestas glândulas.

5- CONCLUSÃO

As glândulas salivares, parótida e submandibular, expressam um perfil proteico distinto uma da outra. Nas fracções de parótida e submandibular foram identificadas respectivamente 125 e 100 proteínas diferentes. Das proteínas presentes na glândula parótida, 73,6% das proteínas foram exclusivamente identificadas nesta glândula. Nas fracções da glândula submandibular, 67% das proteínas identificadas nesta glândula estavam presentes de forma exclusiva. As diferentes fracções das glândulas salivares estudadas apresentaram 33 proteínas em comum.

As glândulas salivares expressam uma grande variedade de calicreínas, principalmente a glândula submandibular. Todas as fracções de glândula submandibular apresentaram várias calicreínas. Comparativamente com a glândula parótida, a glândula submandibular apresenta uma maior variedade de calicreínas, precisamente 15 diferentes (mK1, mK3, mK5, mK6, mK7, mK8, mK9, mK11, mK13, mK16, mK21, mK22, mK24, mK26, mK27). Cerca de 32% das proteínas identificadas nesta glândula pertenciam à família das calicreínas.

Relativamente à glândula parótida, a fracção citoplasmática não apresentou calicreínas; a fracção subcelular que apresentou o maior número de calicreínas foi a dos grânulos secretores. Nas várias fracções a parótida apresentou apenas as calicreínas mK5, mK22, mK26, mK8 e mK9.

O conjunto de proteínas identificadas na fracção dos grânulos secretores de parótida está de acordo com as presentes na saliva. Os grânulos apresentaram no seu conteúdo as formas precursoras de proteínas presentes na saliva, confirmando a glândula parótida como a principal produtora das proteínas presentes na saliva.

Os resultados apresentados demonstram a importância da utilização de várias técnicas, que se complementam, como o caso de 2DE e nano-HPLC, permitindo a identificação de um maior número de proteínas e péptidos e neste caso o melhor conhecimento do proteoma das glândulas salivares.

As metodologias de proteómica e peptidómica são poderosas ferramentas para o conhecimento da composição proteica das glândulas salivares. A combinação destas metodologias com o fraccionamento subcelular permitiu-nos também caracterizar a localização subcelular das proteínas identificadas.

Este trabalho apresenta uma abordagem generalista da composição proteica das diferentes frações das glândulas salivares de ratinho, facilitando o desenvolvimento futuro de investigações mais específicas e/ou relacionadas com uma patologia específica.

6- BIBLIOGRAFIA

Abdolzade-Bavil A, Hayes S, Goretzki L, Kroger M, Anders J, Hendriks R. Convenient and versatile subcellular extraction procedure, that facilitates classical protein expression profiling and functional protein analysis. *Proteomics* 2004;4(5):1397-405.

Amado FM, Vitorino RM, Domingues PM, Lobo MJ, Duarte JA. Analysis of the human saliva proteome. *Expert Rev Proteomics* 2005;2(4):521-39.

Aps JK, Martens LC. Review: The physiology of saliva and transfer of drugs into saliva. *Forensic Sci Int* 2005;150(2-3):119-31.

Arreola J, Melvin JE, Begenisich T. Activation of calcium-dependent chloride channels in rat parotid acinar cells. *J Gen Physiol* 1996;108(1):35-47.

Arreola J, Melvin JE. A novel chloride conductance activated by extracellular ATP in mouse parotid acinar cells. *J Physiol* 2003;547(Pt 1):197-208.

Arvan P, Rudnick G, Castle JD. Osmotic properties and internal pH of isolated rat parotid secretory granules. *J Biol Chem* 1984;259(21):13567-72.

Arvan P, Castle D. Sorting and storage during secretory granule biogenesis: looking backward and looking forward. *Biochem J* 1998;332 (Pt 3):593-610.

Azad NS, Rasool N, Annunziata CM, Minasian L, Whiteley G, Kohn EC. Proteomics in clinical trials and practice: present uses and future promise. *Mol Cell Proteomics* 2006;5(10):1819-29.

Baldys-Waligorska A, Pour A, Moriarty CM, Dowd F. The effect of calcium and cyclic AMP on amylase release in digitonin-permeabilized parotid gland cells. *Biochim Biophys Acta* 1987;929(2):190-6.

Battino M, Ferreiro MS, Gallardo I, Newman HN, Bullon P. The antioxidant capacity of saliva. *J Clin Periodontol* 2002;29(3):189-94.

Bedi GS. The effect of adrenergic agonists and antagonists on the expression of proteins in rat submandibular and parotid glands. *Crit Rev Oral Biol Med* 1993;4(3-4):565-71.

Beuret N, Stettler H, Renold A, Rutishauser J, Spiess M. Expression of regulated secretory proteins is sufficient to generate granule-like structures in constitutively secreting cells. *J Biol Chem* 2004;279(19):20242-9.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-54.

Brodsky FM, Chen CY, Knuehl C, Towler MC, Wakeham DE. Biological basket weaving: formation and function of clathrin-coated vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2001;17:517-68.

Burgoyne RD, Morgan A. Secretory granule exocytosis. *Physiol Rev* 2003;83(2):581-632.

Cameron RS, Castle JD. Isolation and compositional analysis of secretion granules and their membrane subfraction from the rat parotid gland. *J Membr Biol* 1984;79(2):127-44.

Carpenter GH, Proctor GB, Ebersole LE, Garrett JR. Parotid and submandibular cells in response to autonomic stimulation in vitro. *Int Immunopharmacol* 2004;4(8):1005-14.

Cascieri MA, Somberg EW. Two-dimensional electrophoretic analysis of secretory-granule, granule-membrane, and plasma-membrane proteins of rat parotid cells. *Cell Tissue Res* 1983;234(1):93-108.

Case RM, Hunter M, Novak I, Young JA. The anionic basis of fluid secretion by the rabbit mandibular salivary gland. *J Physiol* 1984;349:619-30.

Castle AM, Stahl LE, Castle JD. A 13-amino acid n-terminal domain of a basic proline-rich protein is necessary for storage in secretory granules and facilitates exit from the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 1992;267(18):13093-100.

Castle AM, Castle JD. Novel secretory proline-rich proteoglycans from rat parotid. Cloning and characterization by expression in AtT-20 cells. *J Biol Chem* 1993;268(27):20490-6.

Castle JD, Castle AM. Two regulated secretory pathways for newly synthesized parotid salivary proteins are distinguished by doses of secretagogues. *J Cell Sci* 1996;109(Pt 10):2591-9.

Castle D, Castle A. Intracellular transport and secretion of salivary proteins. *Crit Rev Oral Biol Med* 1998;9(1):4-22.

Castle AM, Huang AY, Castle JD. The minor regulated pathway, a rapid component of salivary secretion, may provide docking/fusion sites for granule exocytosis at the apical surface of acinar cells. *J Cell Sci* 2002;115(Pt 14):2963-73.

Clermont Y, Rambourg A, Hermo L. Trans-Golgi network (TGN) of different cell types: three-dimensional structural characteristics and variability. *Anat Rec* 1995;242(3):289-301.

Detweiler CD, Deterding LJ, Tomer KB, Chignell CF, Germolec D, Mason RP. Immunological identification of the heart myoglobin radical formed by hydrogen peroxide. *Free Radic Biol Med* 2002;33(3):364-9.

Yousef GM, Diamandis EP. The new human tissue kallikrein gene family: structure, function, and association to disease. *Endocr Rev* 2001;22(2):184-204.

Dodds MW, Johnson DA, Yeh CK. Health benefits of saliva: a review. *J Dent* 2005;33(3):223-33.

Dohke Y, Hara-Yokoyama M, Fujita-Yoshigaki J, Kahn RA, Kanaho Y, Hashimoto S, Sugiya H, Furuyama S. Translocation of Arf1 to the secretory granules in rat parotid acinar cells. *Arch Biochem Biophys* 1998;357(1):147-54.

Drahos KL, Tran HC, Kiri AN, Lan W, McRorie DK, Horn MJ. Comparison of Golgi apparatus and endoplasmic reticulum proteins from livers of juvenile and aged rats using a novel technique for separation and enrichment of organelles. *J Biomol Tech* 2005;16(4):347-55.

Eagle H, Oyama VI, Levy M, Freeman A. Myo-inositol as an essential growth factor for normal and malignant human cells in tissue culture. *Science* 1956;123(3202):845-7.

Eguchi T, Ishikawa Y, Ishida H. Mechanism underlying histamine-induced desensitization of amylase secretion in rat parotid glands. *Br J Pharmacol* 1998;124(7):1523-33.

Ellis GL, Auclair PL, Gnepp DR. *Surgical Pathology of the Salivary Glands*. Philadelphia: W. B. Saunders Company; 1991.

Elsner M, Hashimoto H, Nilsson T. Cisternal maturation and vesicle transport: join the band wagon! *Mol Membr Biol* 2003;20(3):221-9.

Evans RL, Bell SM, Schultheis PJ, Shull GE, Melvin JE. Targeted disruption of the *Nhe1* gene prevents muscarinic agonist-induced up-regulation of Na⁽⁺⁾/H⁽⁺⁾ exchange in mouse parotid acinar cells. *J Biol Chem* 1999;274(41):29025-30.

Fasshauer D, Sutton RB, Brunger AT, Jahn R. Conserved structural features of the synaptic fusion complex: SNARE proteins reclassified as Q- and R-SNAREs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95(26):15781-6.

Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* 1989;246(4926):64-71.

Ghafouri B, Tagesson C, Lindahl M. Mapping of proteins in human saliva using two-dimensional gel electrophoresis and peptide mass fingerprinting. *Proteomics* 2003;3(6):1003-15.

Gorr SU, Venkatesh SG, Darling DS. Parotid secretory granules: crossroads of secretory pathways and protein storage. *J Dent Res* 2005;84(6):500-9.

Gresz V, Kwon TH, Gong H, Agre P, Steward MC, King LS, et al.. Immunolocalization of AQP5 in rat parotid and submandibular salivary glands after stimulation or inhibition of secretion in vivo. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004;287:151-161.

Guo T, Rudnick PA, Wang W, Lee CS, Devoe DL, Balgley BM. Characterization of the human salivary proteome by capillary isoelectric focusing/nanoreversed-phase liquid chromatography coupled with ESI-tandem MS. *J Proteome Res.* 2006 Jun;5(6):1469-78.

Hardt M, Thomas LR, Dixon SE, Newport G, Agabian N, Prakobphol A, Hall SC, Witkowska HE, Fisher SJ. Toward defining the human parotid gland salivary proteome and peptidome: identification and characterization using 2D SDS-PAGE, ultrafiltration, HPLC, and mass spectrometry. *Biochemistry* 2005;44(8):2885-99.

Hu, S., Xie, Y., Ramachandran, P., Ogorzalek Loo, R. R., Li, Y. Loo, J. A., Wong, D. T. Large-scale identification of proteins in human salivary proteome by liquid chromatography/mass spectrometry and two-dimensional gel electrophoresis-mass spectrometry. *Proteomics* 2005;5(6):1714-28.

Huang AY, Castle AM, Hinton BT, Castle JD. Resting (basal) secretion of proteins is provided by the minor regulated and constitutive-like pathways and not granule exocytosis in parotid acinar cells. *J Biol Chem* 2001;276(25):22296-306.

Huber LA, Pfaller K, Vietor I. Organelle proteomics: implications for subcellular fractionation in proteomics. *Circ Res* 2003;92(9):962-8.

Huh YH, Jeon SH, Yoo SH. Chromogranin B-induced secretory granule biogenesis: comparison with the similar role of chromogranin A. *J Biol Chem* 2003;278(42):40581-9.

Ishikawa Y, Chen C, Eguchi T, Skowronski MT, Ishida H. Developmental enhancement of secretory response to isoproterenol coupled with increases in beta-adrenoceptor density and Gs protein function in rat parotid tissues. *Mech Ageing Dev* 1998;104(1):75-90.

Ishikawa Y, Yuan Z, Inoue N, Skowronski MT, Nakae Y, Shono M, et al.. Identification of AQP5 in lipid rafts and its translocation to apical membranes by activation of M3 mAChRs in intracellular ducts of rat parotid gland. *Am J Physiol Cell Physiol* 2005;289:C1303–C1311.

Ishikawa Y, Cho G, Yuan Z, Skowronski MT, Pan Y, Ishida H. Water channels and zymogen granules in salivary glands. *J Pharmacol Sci* 2006;100(5):495-512.

Jensen JL, Barkvoll P. Clinical implications of the dry mouth. *Oral mucosal diseases. Ann N Y Acad Sci* 1998;842:156-62.

Karas M, Hillenkamp F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal Chem* 1988;60(20):2299-301.

Keil-Dlouha V V, Zylber N, Imhoff J, Tong N, Keil B. Proteolytic activity of pseudotrypsin. *FEBS Lett* 1971;16(4):291-295.

Klose J, Spielmann H. Gel isoelectric focusing of mouse lactate dehydrogenase: heterogeneity of the isoenzymes A4 and X4. *Biochem Genet.* 1975 Oct;13(9-10):707-20.

Kim T, Tao-Cheng JH, Eiden LE, Loh YP. Chromogranin A, an "on/off" switch controlling dense-core secretory granule biogenesis. *Cell* 2001;106(4):499-509.

Kikkawa Y, Yamanaka N, Tada J, Kanamori N, Tsumura K, Hosoi K. Prorenin processing and restricted endoproteolysis by mouse tissue kallikrein family enzymes (mK1, mK9, mK13, and mK22). *Biochim Biophys Acta* 1998;1382(1):55-64.

Lau KR, Howorth AJ, Case RM. The effects of bumetanide, amiloride and Ba₂⁺ on fluid and electrolyte secretion in rabbit salivary gland. *J Physiol* 1990; 425:407-27.

Lim MS, Elenitoba-Johnson KS. Proteomics in pathology research. *Lab Invest* 2004;84(10):1227-44.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *Journal of Biological Chemistry* 1951;193:265-275.

Ma T, Song Y, Gillespie A, Carlson EJ, Epstein CJ, Verkman AS. Defective secretion of saliva in transgenic mice lacking aquaporin-5 water channels. *J Biol Chem* 1999;274(29):20071-4.

Macfarlane SR, Seatter MJ, Kanke T, Hunter GD, Plevin R. Proteinase-activated receptors. *Pharmacol Rev* 2001;53(2):245-82.

Martinez JR. Developmental aspects of fluid and electrolyte secretion in salivary glands. *Crit Rev Oral Biol Med* 1994;5(3-4):281-90.

Matsuki M, Hashimoto S, Shimono M, Murakami M, Fujita-Yoshinaga J, Furuyama S, et al.. Involvement of aquaporin-5 water channel in osmoregulation in parotid secretory granules. *J Mem Biol* 2005;203:119–126.

Mehansho H, Carlson DM. Induction of protein and glycoprotein synthesis in rat submandibular glands by isoproterenol. *J Biol Chem* 1983;258(10):6616-20.

Melvin JE, Yule D, Shuttleworth T, Begenisich T. Regulation of fluid and electrolyte secretion in salivary gland acinar cells. *Annu Rev Physiol* 2005;67:445-69.

Moore KL. *Clinically Oriented Anatomy*. 2^a ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1992.

Morgan A, Burgoyne RD, Barclay JW, Craig TJ, Prescott GR, Ciuffo LF, Evans GJ, Graham ME. Regulation of exocytosis by protein kinase C. *Biochem Soc Trans* 2005;33(Pt 6):1341-4.

O'Farrell PH. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* 1975;250(10):4007-21.

Oikonomopoulou K, Hansen KK, Saifeddine M, Vergnolle N, Tea I, Blaber M, Blaber SI, Scarisbrick I, Diamandis EP, Hollenberg MD. Kallikrein-mediated cell signalling: targeting proteinase-activated receptors (PARs). *Biol Chem* 2006;387(6):817-24.

Orci L, Ravazzola M, Anderson RG. The condensing vacuole of exocrine cells is more acidic than the mature secretory vesicle. *Nature* 1987;326(6108):77-9.

Palade G. Intracellular aspects of the process of protein synthesis. *Science* 1975;489:347-357.

Patamia M, Messana I, Petruzzelli R, Vitali A, Inzitari R, Cabras T, Fanali C, Scarano E, Contucci A, Galtieri A, Castagnola M. Two proline-rich peptides from pig (*Sus*

scrofa) salivary glands generated by pre-secretory pathway underlying the action of a proteinase cleaving ProAla bonds. *Peptides* 2005;26(9):1550-9.

Pirani D, Evans LA, Cook DI, Young JA. Intracellular pH in the rat mandibular salivary gland: the role of Na-H and Cl-HCO₃ antiports in secretion. *Pflugers Arch* 1987;408(2):178-84.

Quissell DO, Watson E, Dowd FJ. Signal transduction mechanisms involved in salivary gland regulated exocytosis. *Crit Rev Oral Biol Med* 1992;3(1-2):83-107.

Regezi JA. Oral pathology: clinical-pathologic correlations. Philadelphia: W. B. Saunders Company; 1989.

Rhee JS, Betz A, Pyott S, Reim K, Varoqueaux F, Augustin I, Hesse D, Sudhof TC, Takahashi M, Rosenmund C, Brose N. Beta phorbol ester- and diacylglycerol-induced augmentation of transmitter release is mediated by Munc13s and not by PKCs. *Cell* 2002;108(1):121-33.

Rice RH, Means GE, Brown WD. Stabilization of bovine trypsin by reductive methylation. *Biochim Biophys Acta* 1977;492(2):316-21.

Sato F, Kanno T, Nagasawa S, Yanaihara N, Ishida N, Hasegawa T, Iwanaga T. Immunohistochemical localization of chromogranin a in the acinar cells of equine salivary glands contrasts with rodent glands. *Cells Tissues Organs* 2002;172(1):29-36.

Schipper R, Loof A, de Groot J, Harthoorn L, Dransfield E, van Heerde W. SELDI-TOF-MS of saliva: Methodology and pre-treatment effects. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. In Press 2006;

Segawa A, Loffredo F, Puxeddu R, Yamashina S, Testa Riva F, Riva A. Exocytosis in human salivary glands visualized by high-resolution scanning electron microscopy. *Cell Tissue Res* 1998;291(2):325-36.

Sollner T, Whiteheart SW, Brunner M, Erdjument-Bromage H, Geromanos S, Tempst P, Rothman JE. SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature* 1993;362(6418):318-24.

Stasyk T, Huber LA. Zooming in: fractionation strategies in proteomics. *Proteomics* 2004;4(12):3704-16

Takano K, Malamud D, Bennick A, Oppenheim F, Hand AR. Localization of salivary proteins in granules of human parotid and submandibular acinar cells. *Crit Rev Oral Biol Med* 1993;4(3-4):399-405.

Takata K, Matsuzaki T, Tajika Y. Aquaporins; water channel proteins of the cell membrane. *Progr Histochem Cytochem* 2004;39:1–84.

Tooze SA. Biogenesis of secretory granules in the trans-Golgi network of neuroendocrine and endocrine cells. *Biochim Biophys Acta* 1998;1404(1-2):231-44.

Trimble WS, Cowan DM, Scheller RH. VAMP-1: a synaptic vesicle-associated integral membrane protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;85(12):4538-42.

Turner JT, Camden JM. Regulation of secretion by vasoactive intestinal peptide in isolated perfused rat submandibular glands. *Arch Oral Biol* 1992;37(4):281-7.

Turner RJ. Mechanisms of fluid secretion by salivary glands. *Ann N Y Acad Sci* 1993;694:24-35.

Van Nieuw Amerongen A, Bolscher JG, Veerman EC. Salivary proteins: protective and diagnostic value in cariology? *Caries Res* 2004;38(3):247-53.

Venkatesh SG, Gorr SU. A sulfated proteoglycan is necessary for storage of exocrine secretory proteins in the rat parotid gland. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002;283(2):C438-45.

Venkatesh SG, Cowley DJ, Gorr SU. Differential aggregation properties of secretory proteins that are stored in exocrine secretory granules of the pancreas and parotid glands. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004;286(2):C365-71.

Verrills NM. Clinical proteomics: present and future prospects. *Clin Biochem Rev* 2006;27(2):99-116.

Vitorino R, Lobo MJ, Ferrer-Correia AJ, Dubin JR, Tomer KB, Domingues PM, Amado FM. Identification of human whole saliva protein components using proteomics. *Proteomics* 2004;4(4):1109-15.

Vitorino R, Lobo MJ, Duarte JA, Ferrer-Correia AJ, Domingues PM, Amado FM. Analysis of salivary peptides using HPLC-electrospray mass spectrometry. *Biomed Chromatogr* 2004;18(8):570-5.

Vitorino R, Lobo MJ, Duarte JR, Ferrer-Correia AJ, Domingues PM, Amado FM. The role of salivary peptides in dental caries. *Biomed Chromatogr* 2005;19(3):214-22.

Vitorino R, de Moraes Guedes S, Ferreira R, Lobo MJ, Duarte J, Ferrer-Correia AJ, Tomer KB, Domingues PM, Amado FM. Two-dimensional electrophoresis study of in vitro pellicle formation and dental caries susceptibility. *Eur J Oral Sci* 2006;114(2):147-53.

Wallach D, Tessler R, Schramm M. The proteins of the content of the secretory granules of the rat parotid gland. *Biochim Biophys Acta* 1975;382(4):552-64.

Walz A, Stuhler K, Wattenberg A, Hawranke E, Meyer HE, Schmalz G, Bluggel M, Ruhl S. Proteome analysis of glandular parotid and submandibular-sublingual saliva in comparison to whole human saliva by two-dimensional gel electrophoresis. *Proteomics* 2006;6(5):1631-9.

Wang Y, Thiele C, Huttner WB. Cholesterol is required for the formation of regulated and constitutive secretory vesicles from the trans-Golgi network. *Traffic* 2000;1(12):952-62.

Watson EL, DiJulio D, Kauffman D, Iversen J, Robinovitch MR, Izutsu KT. Evidence for G proteins in rat parotid plasma membranes and secretory granule membranes. *Biochem J* 1992;285:441-9.

Wheater PR, Burkitt HG, Daniels VG. *Functional Histology*. New York: Churchill Livingstone; 1979.

Wilkinson, J.M. "Fragmentation of Polypeptides by Enzymic Methods". In: *Practical Protein Chemistry: A Handbook*. A. Darbre, ed. New York: John Wiley and Sons; 1986.

Wilmarth, P. A., Riviere, M. A., Rustvold, D. L., Lauten, J. D, Madden, T. E, David, L L. Two-dimensional liquid chromatography study of the human whole saliva proteome. *J Proteome Res* 2004;3(5):1017–1023.

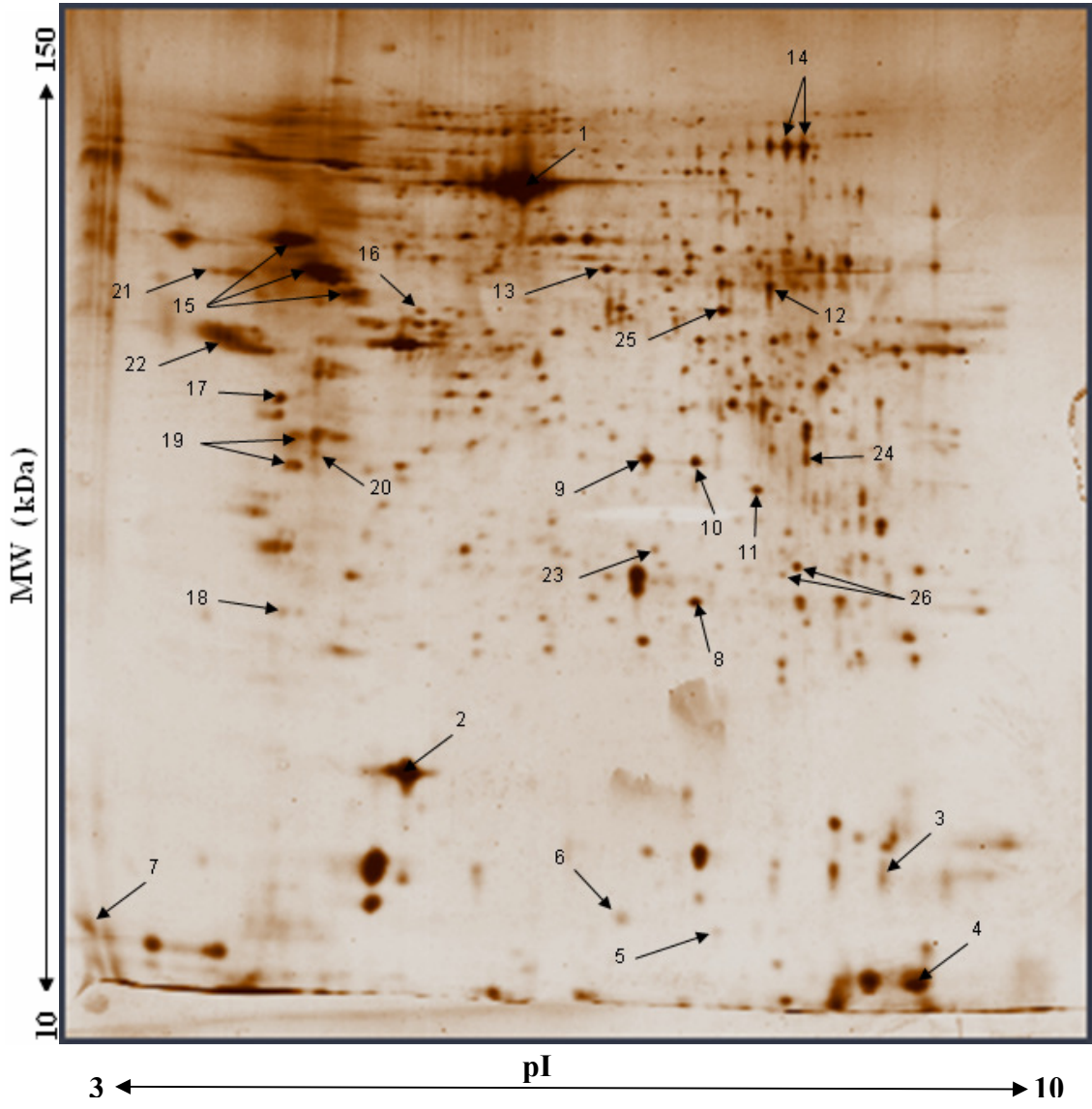
Xie H, Rhodus NL, Griffin RJ, Carlis JV, Griffin TJ. A catalogue of human saliva proteins identified by free flow electrophoresis-based peptide separation and tandem mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics* 2005;4(11):1826-30.

Yan JX, Wait R, Berkelman T, Harry RA, Westbrook JA, Wheeler CH, Dunn MJ. A modified silver staining protocol for visualization of proteins compatible with matrix-assisted laser desorption/ionization and electrospray ionization-mass spectrometry. *Electrophoresis* 2000;21(17):3666-72.

7- ANEXOS

ANEXO I

Citoplasma de parótida



ANEXO II

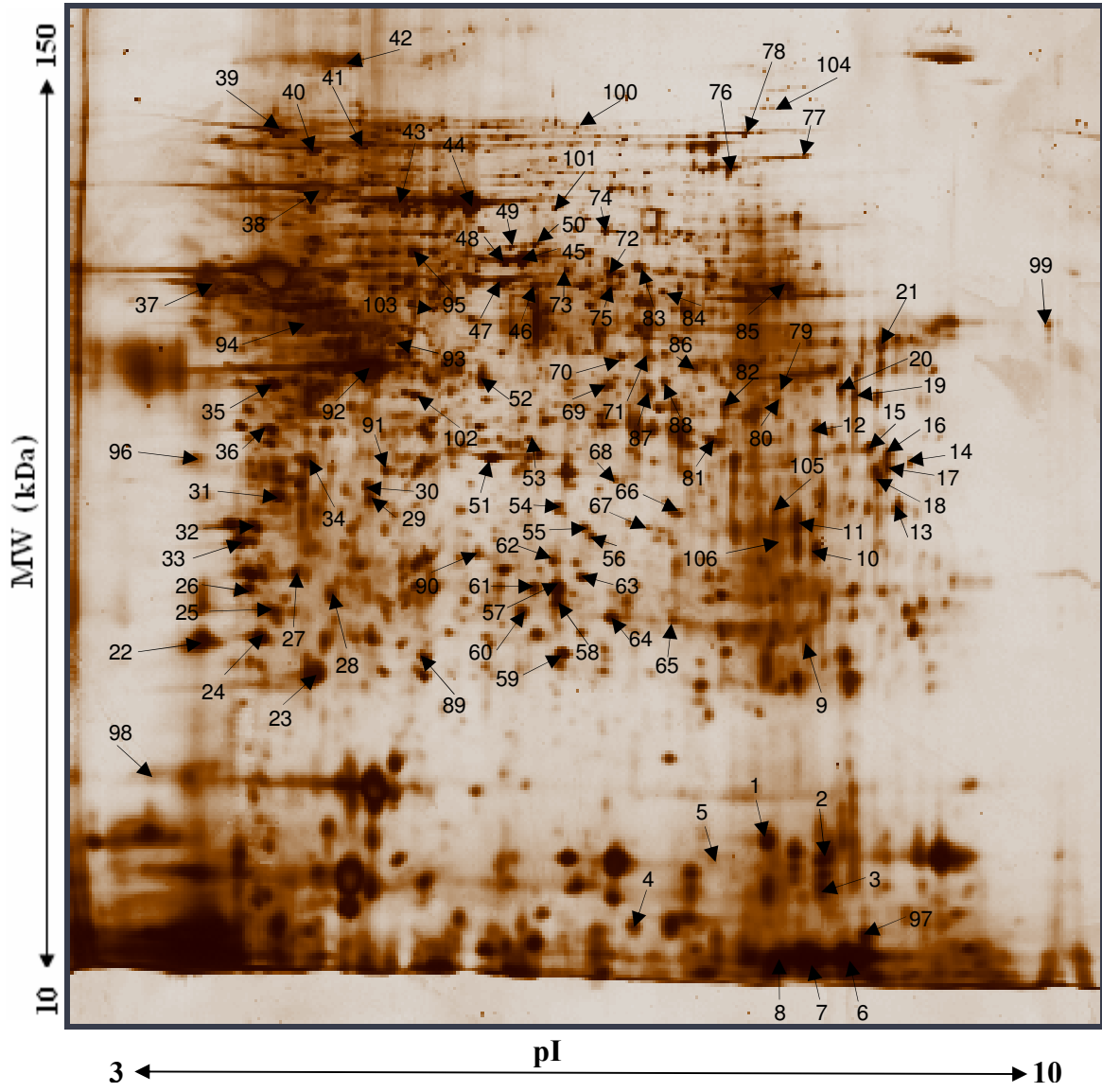
Citoplasma de parótida

Spot	ID	Número de acesso	MW
1	Serum albumin precursor	P07724	68648
2	Major urinary protein 4 precursor (MUP 4)	P11590	20528
3	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A (Cyclophilin A) (Cyclosporin A-binding protein)	P17742	17829
4	Hemoglobin alpha chain	P01942	14945
5	Histidine triad nucleotide-binding protein 1 (Protein kinase C inhibitor 1)	P70349	13637
6	Transthyretin precursor (Prealbumin)	P07309	15766
7	Hemoglobin alpha chain	P19014	14945
8	Peroxiredoxin 6 (EC 1.11.1.-) (Antioxidant protein 2)	O08709	24724
9	Malate dehydrogenase, cytoplasmic	P14152	36323
10	Elongation factor 2 (EF-2)	P58252	95122
11	Heat shock cognate 71 kDa protein (Heat shock 70 kDa protein 8)	P19378	70761
12	4-trimethylaminobutyraldehyde dehydrogenase (Aldehyde dehydrogenase 9A1)	Q9JLJ2	53480
13	Selenium-binding protein 1 (56 kDa selenium-binding protein)	P17563	52318
14	Serotransferrin precursor (Transferrin)	Q921I1	76674
15	Protein disulfide-isomerase precursor	P09103	57108
16	78 kDa glucose-regulated protein precursor (GRP 78) (Immunoglobulin heavy chain binding protein) (BiP)	P20029	72377
17	Heat shock 70 kDa protein 1B (HSP70.1)	P17879	70133
18	Translationally controlled tumor protein (TCTP) (Lens epithelial protein)	P63029	19450
19	Renin 2 precursor (EC 3.4.23.15) (Angiotensinogenase) (Submandibular gland renin)	P00796	44254

20	Coatamer epsilon subunit (Epsilon-coat protein) (Epsilon-COP)	O89079	34414
21	Calreticulin precursor (Calregulin) (Calcium-binding protein 3)	P18418	47966
23	Sialic acid synthase (N-acetylneuraminase synthase)	Q9NR45	40281
24	Aldose reductase (Aldehyde reductase)	P45376	35578
25	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial precursor	P47738	56502
26	Phosphoglycerate mutase 1 (Phosphoglycerate mutase isozyme B)	Q9DBJ1	28683

ANEXO III

Núcleo de parótida



ANEXO IV

Núcleo de parótida

<i>Spots</i>	ID	Número de acesso	MW
1	Nucleoside diphosphate kinase B	Q01768	17352
2	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A (Cyclosporin A-binding protein)	P17742	17829
3	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	P17742	17829
4	Histidine triad nucleotide-binding protein 1 (Protein kinase C inhibitor 1)	P70349	13637
5	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 3	Q91WK2	39807
6	Hemoglobin alpha chain	P01942	14945
7,8	Hemoglobin beta-1 chain	P02088	15699
9	Glutathione S-transferase Mu 2	P15626	25569
10,15	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	P16858	35656
11	Guanine nucleotide-binding protein beta subunit 2-like 1 (Receptor for activated C kinase)	P63244	110932
12	Branched-chain-amino-acid aminotransferase	O35855	44099
13	Voltage-dependent anion-selective channel protein 1	Q60932	32331
14,17	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	O88569	35971
16	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3	Q8BG05	39628
18	Peroxisomal multifunctional enzyme type 2	P51660	79474
19	Fructose-bisphosphate aldolase A	P05064	39200
20	Acetyl-CoA acetyltransferase	Q8QZT1	44787
21	Isocitrate dehydrogenase	P54071	58712
22	Multiple coagulation factor deficiency protein 2 homolog precursor (Neural stem cell derived neuronal survival protein)	Q8K5B2	16158
23	Phosphatidylethanolamine-binding protein [Contains: Hippocampal cholinergic neurostimulating peptide]	P70296	20686
24	Translationally controlled tumor protein	P63029	19450
25	Tumor protein D52	Q62393	20047

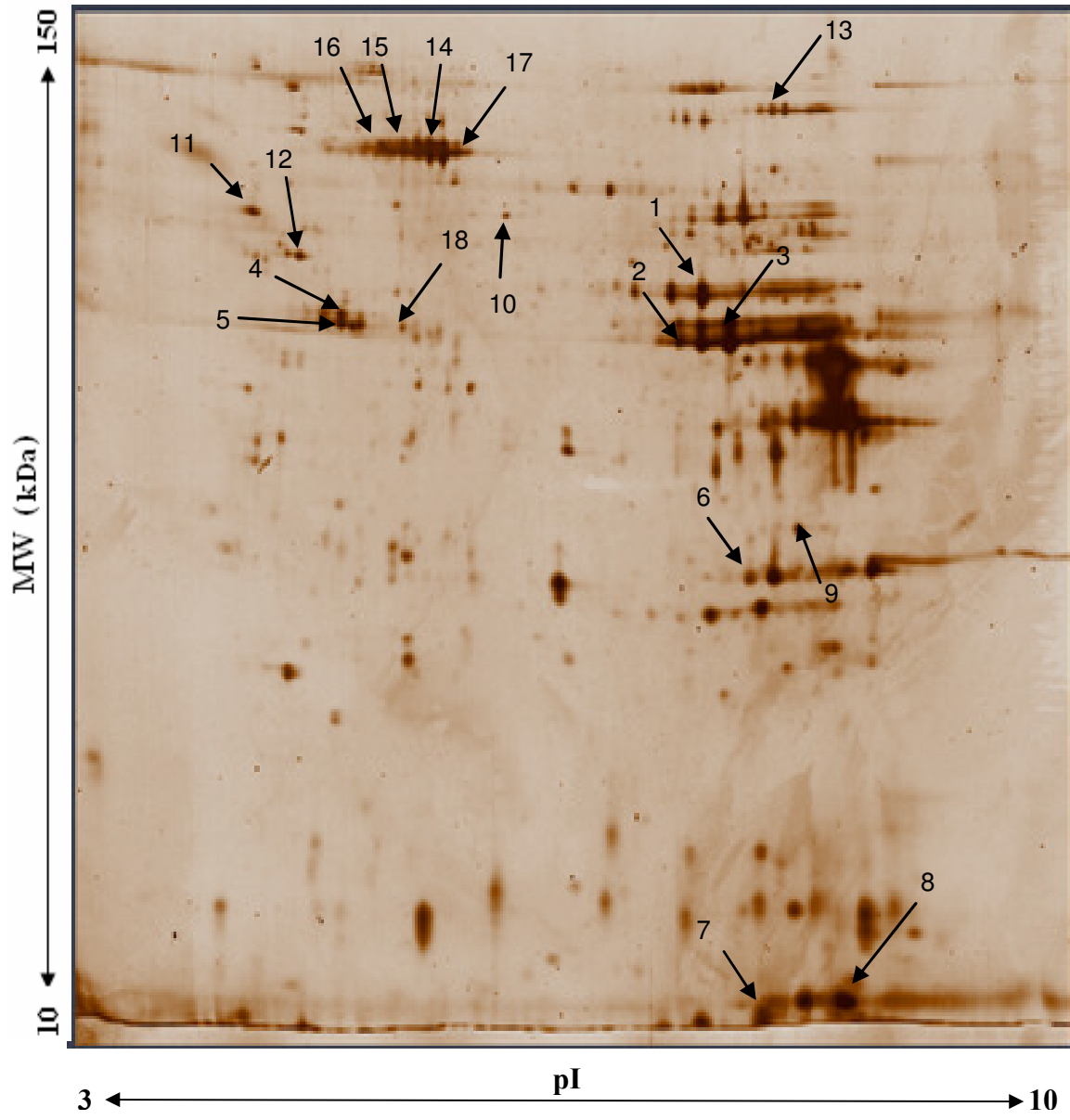
26	14-3-3 protein zeta/delta (Protein kinase C inhibitor protein-1)	P63104	27728
27,32	Protein disulfide-isomerase precursor	P09103	57108
28	Rho GDP-dissociation inhibitor 1	Q99PT1	23393
29	Alpha-soluble NSF attachment protein (SNAP-alpha) (N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein alpha)	Q9DB05	33168
30	Spermidine synthase	Q64674	33973
31	Annexin A5 (Annexin V)	P48036	35730
33	14-3-3 protein epsilon	P62258	29155
34	Renin 2 precursor (Submandibular gland renin)	P00796	44254
35	40S ribosomal protein SA	P38982	32729
36	Keratin, type I cytoskeletal 18 (Cytokeratin 18)	P05784	47344
37	Calreticulin precursor (Calregulin)	P18418	47966
38	78 kDa glucose-regulated protein precursor (Immunoglobulin heavy chain binding protein)	P06761	72302
39	Endoplasmin precursor	P08113	92418
40	Heat shock protein HSP 90-beta (HSP 84) (Tumor specific transplantation 84 kDa antigen)	P11499	83142
41	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	P55072	89135
42	150 kDa oxygen-regulated protein precursor	Q60432	111202
43	Heat shock cognate 71 kDa protein	P63017	70827
44	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 2 (TGF-beta receptor interacting protein 1)	Q9QZD9	36438
45	Thioredoxin-dependent peroxide reductase	P20108	28109
46	Selenium-binding protein 2	Q63836	52594
47	Keratin, type II cytoskeletal 8 (Cytokeratin 8)	P11679	54284
48	Serum albumin precursor	P07724	68648
49	T-complex protein 1, epsilon subunit	P80316	59586
50	T-complex protein 1, alpha subunit B	P11983	60411
51	60S acidic ribosomal protein P0	P14869	34195
52	Cathepsin D precursor	P18242	44925
53,81	Transaldolase (EC 2.2.1.2)	P37837	37516
54,9	Protein disulfide-isomerase A3 precursor	P27773	56586
55	3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase	Q99L13	35417
56	Proteasome subunit alpha type 1	Q9R1P4	29528

57,58	Glandular kallikrein K22 precursor (mGK-22) (Epidermal growth factor-binding protein type A) (Nerve growth factor beta chain endopeptidase) (Beta-NGF-endopeptidase)	P15948	28365
59	DJ-1 protein	Q99LX0	20008
60,64	Peroxiredoxin 6 (Antioxidant protein 2)	O08709	24724
61	Phosphomannomutase 2	Q9Z2M7	27639
62	Proteasome subunit beta type 7 precursor	P70195	29872
63	Endoplasmic reticulum protein ERp29 precursor	P57759	28805
65	Protein C14orf166 homolog	Q9CQE8	28135
66	Heat shock cognate 71 kDa protein (Heat shock 70 kDa protein 8)	P19378	70761
67	3-mercaptopyruvate sulfurtransferase	Q99J99	32871
68,78	Elongation factor 2 (EF-2)	P05086	95132
69	DnaJ homolog subfamily B member 11 precursor	Q99KV1	40530
70	Adenosylhomocysteinase	P10760	47376
71	Alpha enolase (Enolase 1)	P17182	46980
72	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	Q61753	56418
73	Seryl-tRNA synthetase	P26638	58221
74	Coatmer delta subunit (Delta-coat protein)	P53619	57238
75	PRP19/PSO4 homolog (Neuronal differentiation-related gene protein)	Q9JMJ4	55213
76	Serotransferrin precursor (Transferrin)	Q921I1	76674
77	Aconitate hydratase, mitochondrial precursor	Q9ER34	85380
79	Phosphoglycerate kinase 1	P09411	44377
80	Sialic acid synthase (N-acetylneuraminase synthase)	Q9NR45	40281
82	Poly(rC)-binding protein 1	P60335	37474
83,84	Alpha-amylase 1 precursor (Salivary and hepatic alpha-amylase)	P00687	57587
85	Methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase	Q02253	57771
86	Glutamine synthetase	P15105	42118
87	GDP-L-fucose synthetase	P23591	35855
88	Isovaleryl-CoA dehydrogenase	P12007	46406
89	Membrane protein p24B precursor	Q9Y3Q3	24761
91	Inorganic pyrophosphatase	Q9D819	32646

92	Actin, cytoplasmic 1 (Beta-actin)	Q71FK5	41710
93	Eukaryotic initiation factor 4A-I	P60843	46125
94	Protein disulfide-isomerase A6 precursor	Q63081	47191
95	60 kDa heat shock protein,	P63039	60917
96	Keratin, type II cytoskeletal 8 (Cytokeratin 8)	P11679	54284
97	Profilin-1	P62963	14816
98	Transcription factor BTF3 (RNA polymerase B transcription factor 3)	Q64152	21989
99	Elongation factor 1-alpha 1(Elongation factor 1 A-1)	P10126	50082
100	Vinculin	Q64727	116513
101	Sec1 family domain containing protein 1	Q8BRF7	72277
102	Thioredoxin-like protein 2 (PKC-theta-interacting protein)	Q9CQM9	37754
103	Vigilin (HDL-binding protein)	Q00341	141352
104	Staphylococcal nuclease domain containing protein 1	Q78PY7	102025
105,106	Glycine N-methyltransferase	Q9QXF8	32523

ANEXO V

Citoplasma das células acinares de parótida



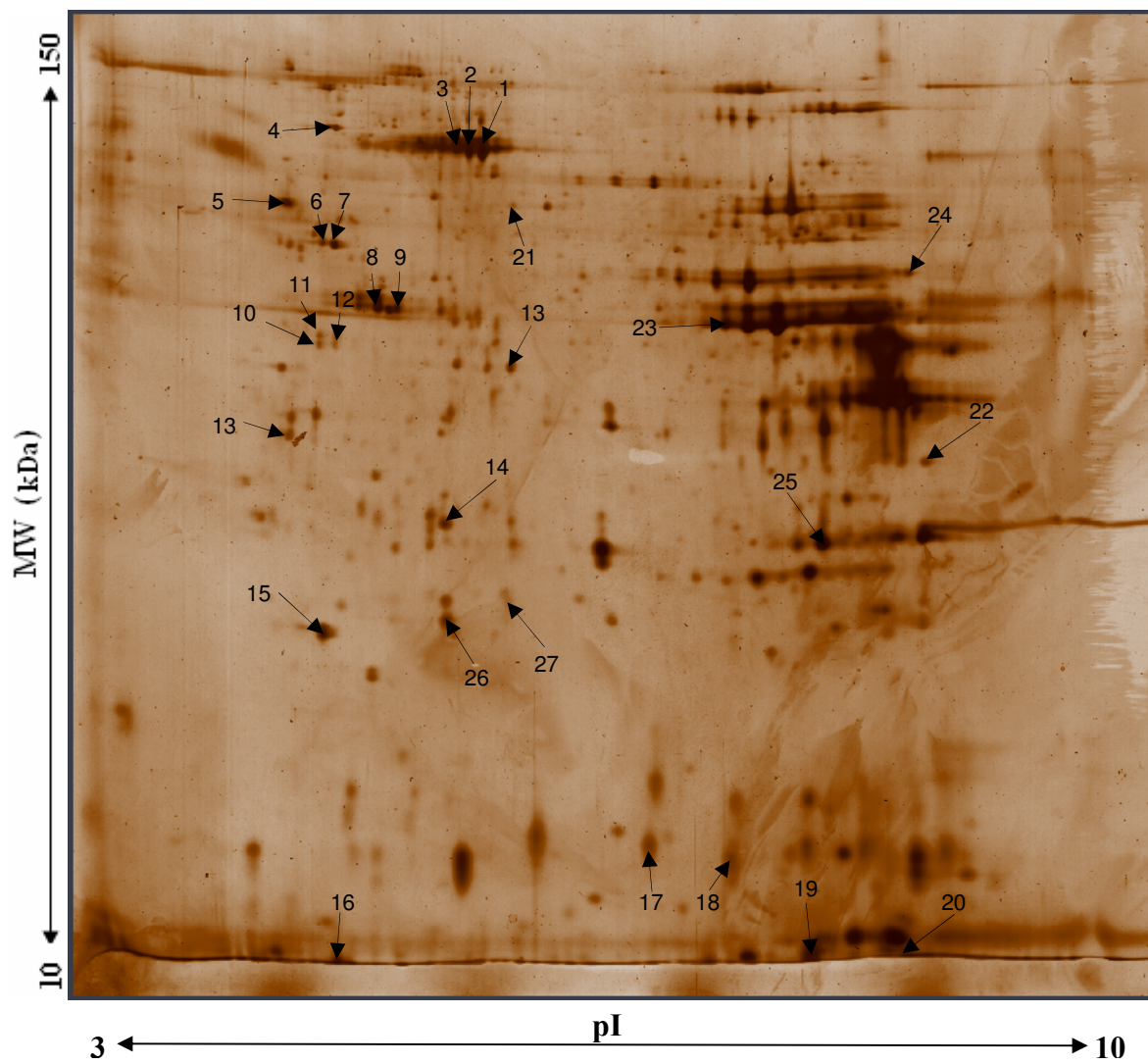
ANEXO VI

Citoplasma das células acinares de parótida

Spots	ID	Número de acesso	MW
1	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial precursor	P47738	56502
2	Alpha enolase (Non-neural enolase)	P17182	46980
3	Beta enolase (2-phospho-D-glycerate hydro-lyase)	P21550	46864
4,5	Carbonic anhydrase III (Carbonate dehydratase III)	P16015	29217
6	Fructose-bisphosphate aldolase A	P05064	39200
7	Glandular kallikrein K9 precursor (mGK-9) (Epidermal growth factor-binding protein type C)	P15949	28882
8	Hemoglobin beta-1 chain	P02088	15699
9	Phosphoglycerate mutase 2	O70250	28678
10	Protein disulfide-isomerase A3 precursor	P27773	56586
11,12	Protein disulfide-isomerase precursor	P09103	57108
13	Serotransferrin precursor (Transferrin)	Q92111	76674
14,15,16,17	Serum albumin precursor	P07724	68648
18	Stress-70 protein, mitochondrial precursor	P38647	73483

ANEXO VII

Grânulos de parótida



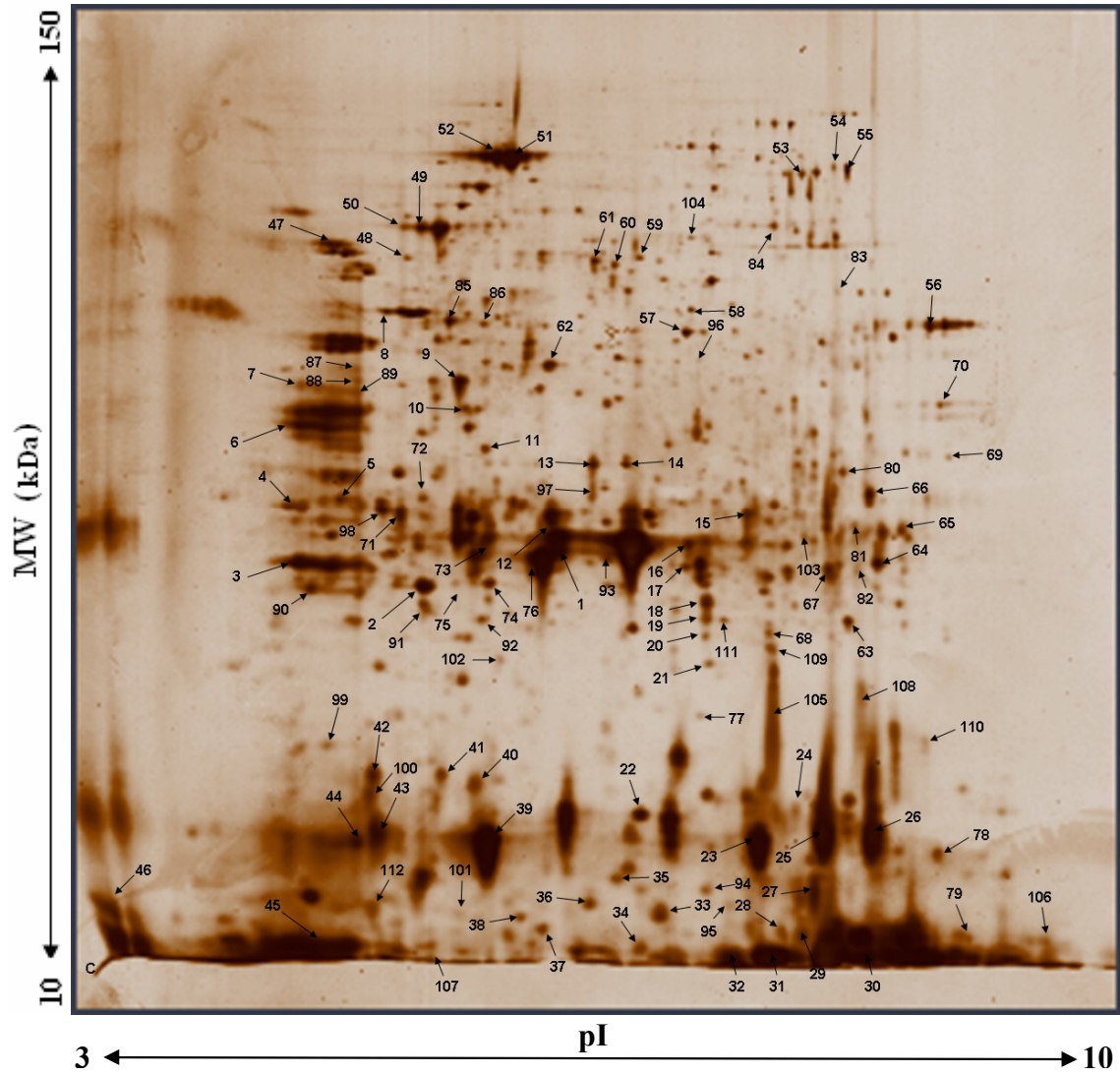
ANEXO VIII

Grânulos de parótida

Spots	ID	Número de acesso	MW
1,2,3,5	Serum albumin precursor	P07724	68648
4	78 kDa glucose-regulated protein precursor (Immunoglobulin heavy chain binding protein)	P06761	72302
6,7	ATP synthase beta chain, mitochondrial precursor	P06576	56525
8	Actin, alpha cardiac (Alpha-cardiac actin)	P62736	41992
9	Actin, cytoplasmic 1 (Beta-actin)	P84336	41775
10,11	Placental thrombin inhibitor (Protease inhibitor 6)	Q60854	42571
12	Annexin A5	P48036	35730
13	Renin 2 precursor (Submandibular gland renin)	P00796	44254
14	Glandular kallikrein K6 precursor (mGK-6)	P15947	28756
15	Alpha-amylase 1 precursor (Salivary and hepatic alpha-amylase)	P00687	57587
16,17	Gamma-renin, submandibular gland precursor (mGK-16)	P04071	28703
18	Glandular kallikrein K8 precursor (mGK-8)	P07628	28513
19	Glandular kallikrein K9 precursor (mGK-9) (Epidermal growth factor-binding protein type C)	P15949	28882
20	Glandular kallikrein K26 precursor (mGK-26) (Prorenin-converting enzyme 2)	P36369	28444
21	Protein disulfide-isomerase A3 precursor	P27773	56586
22	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	P04797	35682
23	Alpha enolase (Enolase 1)	P04764	46967
24	Phosphoglycerate kinase 1	P00559	44443
25	Phosphoglycerate mutase 1	Q9DBJ1	28683
26	ATP synthase D chain, mitochondrial	Q9DCX2	18607
27	Ferritin light chain 1	P29391	20658

ANEXO IX

Citoplasma de submandibular



ANEXO X

Citoplasma de submandibular

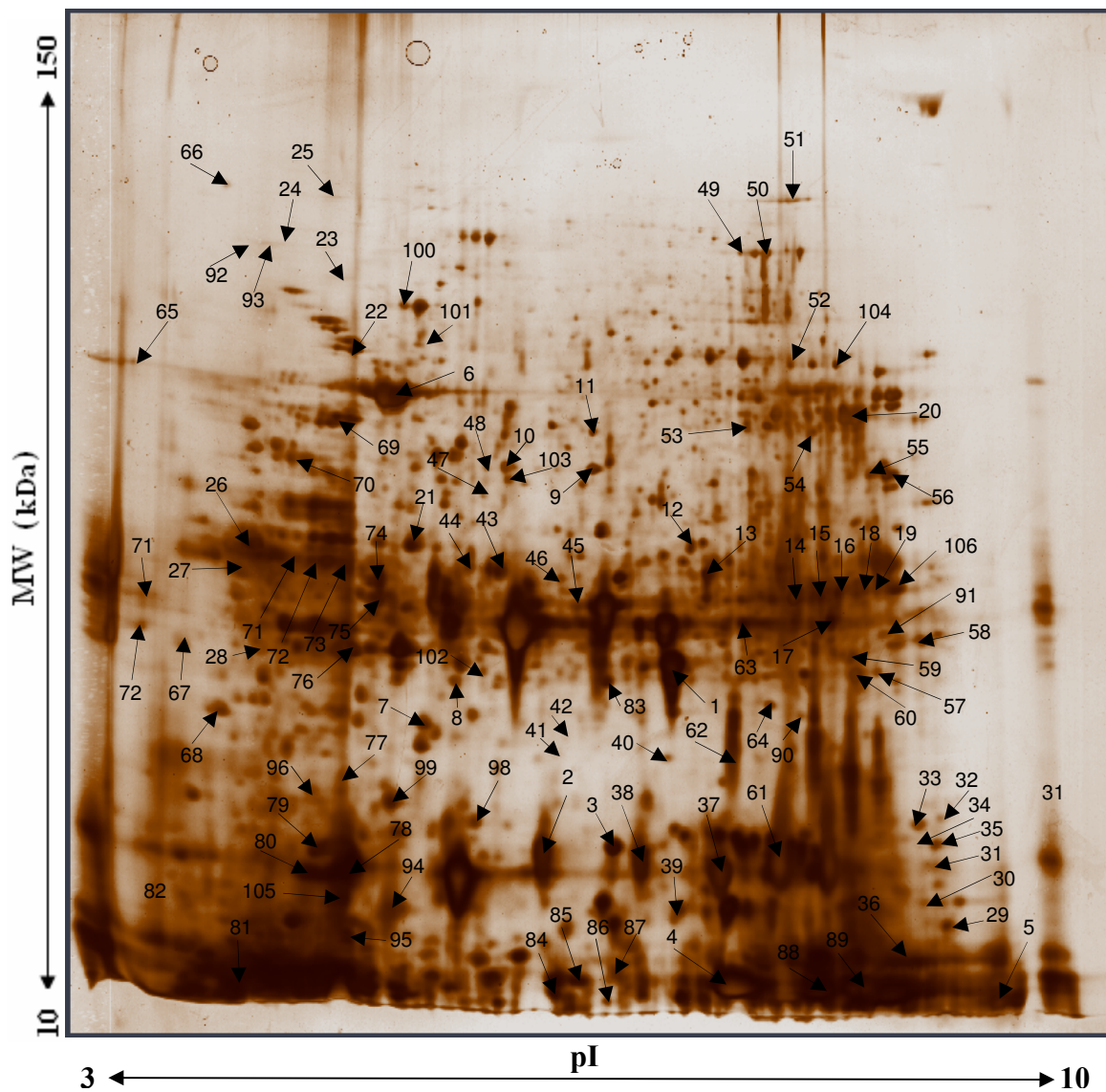
<i>Spots</i>	ID	Número de Acesso	MW
1, 18, 19, 20, 39, 43, 74, 83, 112	Glandular kallikrein K22 precursor (mGK-22) (Epidermal growth factor-binding protein type A)	P15948	28365
2, 3, 6, 37, 40, 88, 89, 90, 92	Renin 2 precursor (Submandibular gland renin)	P00796	44254
4, 21	78 kDa glucose-regulated protein precursor (Immunoglobulin heavy chain binding protein)	P20029	72377
5, 7, 47	Protein disulfide-isomerase precursor	P09103	57108
8	Actin, alpha cardiac (Alpha-cardiac actin)	P68033	41992
9, 10, 12, 13, 16, 27, 42, 48, 49,50, 51, 52, 58, 60, 61, 62, 85,97, 100	Serum albumin precursor	P07724	68648
11	Cytochrome c oxidase polypeptide Va, mitochondrial precursor	P00426	16725
14	Protein disulfide-isomerase A3 precursor	P27773	56586
15, 26, 45, 75	Glandular kallikrein K26 precursor (mGK-26) (Prorenin-converting enzyme 2)	P36369	28444
17, 102	Peroxiredoxin 6 (Antioxidant protein 2)	O08709	24724
22	ATP synthase D chain, mitochondrial	Q9DCX2	18607
23, 36, 65	Glandular kallikrein K8 precursor (mGK-8)	P07628	28513
24, 66, 69, 106, 110	Glandular kallikrein K27 precursor (mGK-27)	Q9JM71	28724
25	Glandular kallikrein K13 precursor (mGK-13) (Epidermal growth factor-binding protein type B)(Prorenin-converting enzyme)	P36368	28671
28, 30, 78, 108	Glandular kallikrein K11 precursor (mGK-11)	P15946	28708

29, 31, 32, 41,	Glandular kallikrein K9 precursor (mGK-9)	P15949	28882
80, 81, 95, 105	(Epidermal growth factor-binding protein type C)		
33	Nucleoside diphosphate kinase B	Q01768	17352
34	Lysosomal alpha-mannosidase precursor	O09159	114532
35	Transthyretin precursor (Prealbumin)	P07309	15766
38	Calreticulin precursor (Calregulin)	P14211	47965
44, 73	Glandular kallikrein K5 precursor (mGK-5)	P15945	28729
46, 96	Hemoglobin alpha chain	P01942	14945
53	7S nerve growth factor alpha chain precursor (Alpha-NGF)	P00757	28530
54, 59, 104	Aconitate hydratase, mitochondrial precursor	Q99KI0	85410
55	Transketolase	P40142	67588
56	Elongation factor 1-alpha 1 (Elongation factor 1 A-1)	P10126	50082
57, 68	Alpha enolase (Non-neural enolase)	P17182	46980
63	Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial precursor	P09671	24588
64	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	P16858	35656
67, 82	Triosephosphate isomerase (Triose-phosphate isomerase)	P17751	26565
70	Malate dehydrogenase, mitochondrial precursor	P08249	35574
71, 72	Gamma-renin, submandibular gland precursor	P04071	28703
76, 91, 93	Placental thrombin inhibitor (Protease inhibitor 6)	Q60854	42571
77, 98	Heat shock cognate 71 kDa protein	Q71U34	70854
79	Galectin-3 (Carbohydrate binding protein 35)	P16110	27366
84	Ubiquitin-activating enzyme E1 1	Q02053	117734
86	Serotransferrin precursor (Transferrin)	Q92111	76674
87	Carbonic anhydrase VI precursor (Salivary carbonic anhydrase)	P18761	36326
94	Histidine triad nucleotide-binding protein 1(Protein kinase C-interacting protein 1)	P70349	13637
99	Actin, cytoplasmic 2 (Gamma-actin)	P63261	41766
101	14-3-3 protein epsilon	P62258	29155
103	Fructose-bisphosphate aldolase A (Aldolase 1)	P05064	39200
107	Transgelin	P37804	22430

109	Aldose reductase (Aldehyde reductase)	P45376	35578
111	ATP synthase alpha chain, mitochondrial	Q03265	59716

ANEXO XI

Núcleo de submandibular



ANEXO XII

Núcleo de submandibular

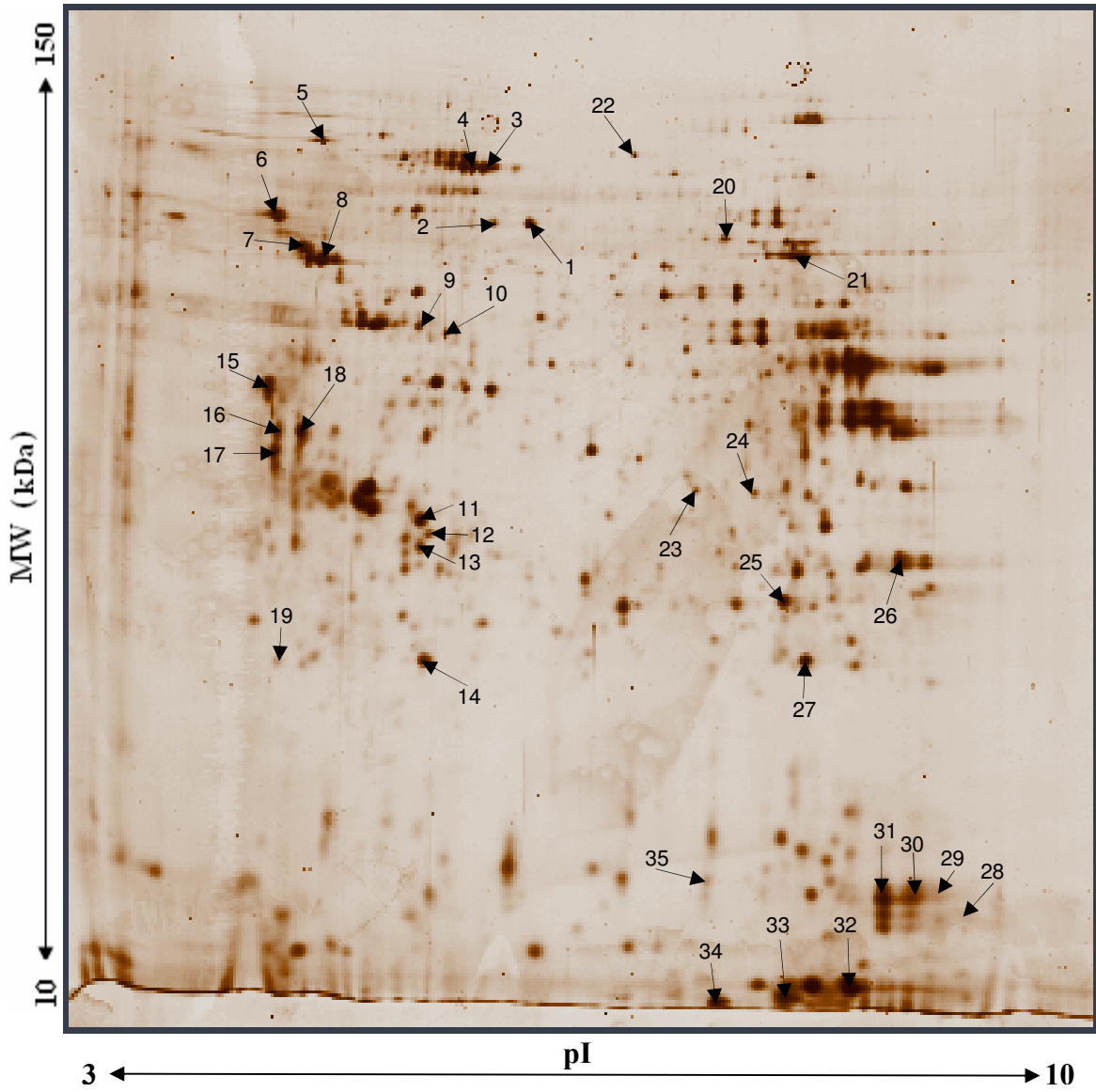
<i>Spots</i>	ID	Número de acesso	MW
1	Glandular kallikrein K22 precursor (mGK-22) (Epidermal growth factor-binding protein type A)	P15948	28365
2,36,38	Gamma-renin, submandibular gland precursor (mGK-16)	P04071	28703
4,62,82,96	Glandular kallikrein K9 precursor (mGK-9) (Epidermal growth factor-binding protein type C)	P15949	28882
5,15,18, 19,81, 105	Glandular kallikrein K27 precursor (mGK-27)	Q9JM71	28724
6,7,10,78	Actin, alpha cardiac (Alpha-cardiac actin)	P68033	41992
8,32,95	Renin 2 precursor (Submandibular gland renin)	P00796	44254
9	Filamin A (Actin-binding protein 280) (ABP-280)	Q8BTM8	281018
11	Sodium/potassium-transporting ATPase alpha-1 chain precursor	P06685	112982
12	Adenylyl cyclase-associated protein 1 (CAP 1)	Q08163	51383
13,61,106	Glandular kallikrein K26 precursor (mGK-26) (Prorenin-converting enzyme 2)	P36369	28444
14	Guanine nucleotide-binding protein beta subunit 2- like 1(Receptor for activated C kinase)	P63244	35055
16,37	Glandular kallikrein K8 precursor (mGK-8)	P07628	28513
17	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	P16858	35656
20	Elongation factor 1-alpha 1 (EF-1-alpha-1)	P68103	50109
21,39,76, 102	Actin, cytoplasmic 1 (Beta-actin)	P84336	41775
22	ATP synthase beta chain, mitochondrial precursor	P56480	56265
23,24,25, 44,48,69, 91,92	Myosin heavy chain, smooth muscle isoform	O08638	226888
26	Elongation factor 1-beta (EF-1-beta)	P34826	24602

27,67,68	Calreticulin precursor (Calregulin)	P14211	47966
28	Keratin, type I cytoskeletal 18	P05784	47344
29	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B precursor	P23284	22728
30	40S ribosomal protein SA	P08865	32702
31,33	78 kDa glucose-regulated protein precursor (Immunoglobulin heavy chain binding protein)	P07823	72334
34,49,50	Aconitate hydratase, mitochondrial precursor	Q99KI0	85410
35	Neutral alpha-glucosidase AB precursor	Q8BHN3	106844
40	Heat shock cognate 71 kDa protein	P11142	70854
41,42	Glutathione S-transferase Mu 1	P10649	25822
43,45,74	Protein disulfide-isomerase A3 precursor	P27773	56586
46	Elongation factor 2 (EF-2)	P13639	95146
47,71,75	Actin, gamma-enteric smooth muscle (Alpha-actin 3)	P63268	41850
51	Collagen alpha 2 chain precursor	Q02788	109743
52	Lysosomal alpha-mannosidase precursor	O09159	114532
53	Spectrin alpha chain	P16086	284462
54	26S protease regulatory subunit S10B	P62334	44145
55	Fructose-bisphosphate aldolase A (Aldolase 1)	P05064	39200
56	Malate dehydrogenase, mitochondrial precursor	P08249	35574
57	Transketolase	P40142	67588
58,66	150 kDa oxygen-regulated protein precursor	Q60432	111202
59,87	Hemoglobin beta-1 chain	P02088	15699
60	Peroxiredoxin 1	P35700	22162
63	Triosephosphate isomerase	P17751	26565
64,104	ATP synthase alpha chain, mitochondrial precursor	Q03265	59716
65	Alpha-1-antitrypsin 1-3 precursor (Alpha-1 protease inhibitor 3)	Q00896	45825
70	Carbonic anhydrase VI precursor (Salivary carbonic anhydrase)	P18761	36326
72,73,77	Protein disulfide-isomerase precursor	P09103	57108
79, 80	Endoplasmic precursor	Q95M18	92369
83	Pyruvate kinase, isozyme M2	P52480	57719
84	Coatomer beta subunit	P35605	102166
85,86,94	Glandular kallikrein K5 precursor (mGK-5)	P15945	28729

88	Glandular kallikrein K1 precursor (mGK-1)	P00755	29003
89	Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial precursor	P09671	24588
90	Voltage-dependent anion-selective channel protein 1	Q60932	32331
93,98,99	Serum albumin precursor	P07724	68648
97	Actin, cytoplasmic 2 (Gamma-actin)	P63261	41766
100	Calmodulin (CaM)	P62158	16696
101	Vigilin (High density lipoprotein-binding protein)	Q00341	141352
103	Keratin, type I cytoskeletal 9	P35527	61950

ANEXO XIII

Citoplasma das células acinares de submandibular



ANEXO XIV

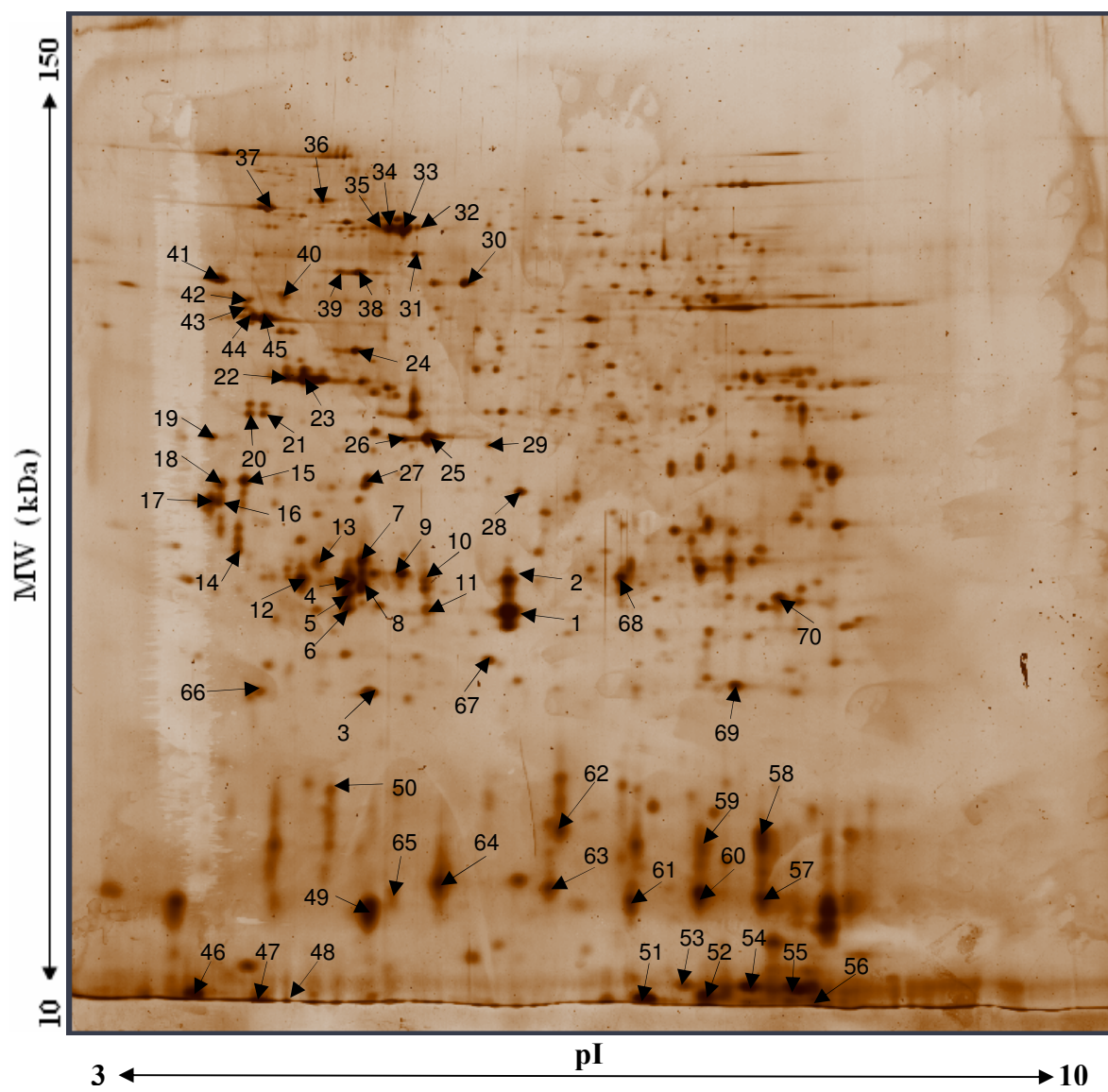
Citoplasma das células acinares de submandibular

<i>Spots</i>	ID	Número de acesso	MW
1,2	Protein disulfide-isomerase A3 precursor	P27773	56586
3,4	Serum albumin precursor	P07724	68648
5	78 kDa glucose-regulated protein precursor (Immunoglobulin heavy chain binding protein)	P06761	72302
6	Protein disulfide-isomerase precursor	P09103	57108
7	ATP synthase beta chain, mitochondrial precursor	P06576	56525
8	Nucleobindin 2 precursor (DNA-binding protein NEFA)	P81117	50273
9, 10	Succinyl-CoA ligase beta-chain, mitochondrial precursor	Q9Z2I9	50082
11	Pyruvate dehydrogenase E1 component beta subunit	Q9D051	38912
12	Prohibitin (B-cell receptor associated protein 32)	P67778	29802
13	Glandular kallikrein K5 precursor (mGK-5)	P15945	28729
14	ATP synthase D chain, mitochondrial	Q9DCX2	18607
15	Keratin, type I cytoskeletal 18	P05784	47344
16	Annexin A5 (Annexin V)	P48036	35730
17,18	Glandular kallikrein K6 precursor (mGK-6)	P15947	28756
19	Parotid secretory protein precursor (PSP)	P07743	24738
20	Serine/threonine protein phosphatase with EF-hands-1	O35655	31712
21	ATP synthase alpha chain, mitochondrial precursor	Q03265	59716
22	Succinate dehydrogenase flavoprotein subunit	Q8K2B3	72539
23	Lysosomal alpha-mannosidase precursor	O09159	114532
24	Elongation factor 2 (EF-2)	P58252	95146
25,28,	Glandular kallikrein K26 precursor (mGK-26)	P36369	28444
29,31	(Prorenin-converting enzyme 2)		
26	Voltage-dependent anion-selective channel protein 1	Q60932	32331
27	Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial precursor	P09671	24588
	Glandular kallikrein K13 precursor (mGK-13)		
30	(Epidermal growth factor-binding protein type B) (Prorenin-converting enzyme)	P36368	28671

32	Hemoglobin alpha chain	P20854	15143
33,34	Glandular kallikrein K9 precursor (mGK-9) (Epidermal growth factor-binding protein type C)	P15949	28882
35	Glandular kallikrein K8 precursor (mGK-8)	P07628	28513

ANEXO XV

Grânulos de submandibular



ANEXO XVI

Grânulos de submandibular

<i>Spots</i>	ID	Número de acesso	MW
1,2,10, 11, 49	Glandular kallikrein K22 precursor (mGK-22) (Nerve growth factor beta chain endopeptidase)	P15948	28365
3	ATP synthase D chain, mitochondrial	Q9DCX2	18607
4,5,6,12,19, 63,64,65	Gamma-renin, submandibular gland precursor (mGK-16)	P04071	28703
7,8,13	Glandular kallikrein K5 precursor (mGK-5)	P15945	28729
9,62	Glandular kallikrein K11 precursor (mGK-11)	P15946	28708
14,16	Glandular kallikrein K6 precursor (mGK-6)	P15947	28756
15,18,25,29	Renin 2 precursor (Submandibular gland renin)	P00796	44254
17,50	7S nerve growth factor alpha chain precursor (Alpha-NGF)	P00757	28530
20,21	Placental thrombin inhibitor (Protease inhibitor 6)	Q60854	42571
22	Protein disulfide-isomerase A3 precursor	P27773	56586
23	Actin, cytoplasmic 1 (Beta-actin)	Q71FK5	41710
24	Ubiquinol-cytochrome-c reductase complex core protein I, mitochondrial precursor	Q9CZ13	52735
26	Isocitrate dehydrogenase subunit alpha, mitochondrial precursor	Q28480	37574
27	Pyruvate dehydrogenase E1 component beta subunit, mitochondrial precursor	Q9D051	38912
28	Malate dehydrogenase, cytoplasmic	P14152	36323
30,31	Protein disulfide-isomerase A3 precursor	P27773	56586
32,33,34,35	Serum albumin precursor	P07724	68648
36	NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit, mitochondrial precursor	Q91VD9	79698
37	78 kDa glucose-regulated protein precursor (Immunoglobulin heavy chain binding protein)	P20029	72377
38,39	60 kDa heat shock protein, mitochondrial precursor	P63039	60917

40	Tubulin alpha-6 chain (Alpha-tubulin 6)	P68373	49877
41	Protein disulfide-isomerase precursor	P09103	57108
42	Tubulin beta-chain	P68372	49799
43,44,45	ATP synthase beta chain, mitochondrial precursor	P56480	56265
46,57,58,	Glandular kallikrein K26 precursor (mGK-26)	P36369	28444
59,60,69	(Prorenin-converting enzyme 2)		
47,48,55,56	Glandular kallikrein K13 precursor (mGK-13)	P36368	28671
	(Epidermal growth factor-binding protein type B) (Prorenin-converting enzyme)		
51,52	Glandular kallikrein K9 precursor (mGK-9)	P15949	28882
	(Epidermal growth factor-binding protein type C)		
53	Cytochrome c oxidase polypeptide VIa-liver, mitochondrial precursor	P43024	12344
54	Hemoglobin beta-1 chain (Hemoglobin beta-major chain)	P02088	15699
61,68	Glandular kallikrein K8 precursor (mGK-8)	P07628	28513
66	Phosphatidylethanolamine-binding protein [Cnains: Hippocampal cholinergic neurostimulating peptide]	P70296	20686
67	Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrial precursor	P20108	28109
70	Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial precursor	P09671	24588