



UNIVERSIDADE DE ÉVORA

ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

Mestrado em Bioquímica

Dissertação de Mestrado

**Estudo da Relação entre a
Composição Proteica da Saliva e a
Sensibilidade para o Gosto Amargo.**

Autor:

Márcia Andreia Soares Sequeira

Orientador: Doutora Elsa Lamy

Co-Orientador: Professora Doutora Célia Antunes

Évora, Janeiro 2013



UNIVERSIDADE DE ÉVORA

ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

Mestrado em Bioquímica

Dissertação de Mestrado

**Estudo da Relação entre a
Composição Proteica da Saliva e a
Sensibilidade para o Gosto Amargo.**

Autor:

Márcia Andreia Soares Sequeira

Orientador: Doutora Elsa Lamy

Co-Orientador: Professora Doutora Célia Antunes

Évora, Janeiro 2013

Agradecimentos

Começo por expressar um agradecimento especial e profundo primeiramente a Deus, pela proteção e por nenhum momento ter-me deixado enfraquecer em situações difíceis.

Quero manifestar o meu agradecimento especial aos meus avós, por quem sinto um amor, gratidão e saudade eterna, agradeço a criação, o amor, os ensinamentos, a eles devo a pessoa que sou hoje.

Agradeço aos meus maravilhosos pais, por todo o apoio, incentivo, amizade e amor incondicional, que me têm dado ao longo do meu percurso académico, e ao longo de toda a minha vida. Aos meus irmãos e a toda a minha família, pelo incentivo, companheirismo e ajuda em todos os momentos.

Quero expressar um agradecimento muito especial e sincero a minha orientadora científica, a Doutora Elsa Lamy, pelo apoio, orientação, ensinamentos, disponibilidade e acima de tudo pela oportunidade de trabalhar ao seu lado neste projeto.

Um agradecimento muito especial à professora Doutora Ana Costa, pelos ensinamentos essenciais, apoio, pela disponibilidade e estímulo na aquisição de conhecimentos científicos. O meu muito Obrigada.

Quero agradecer á minha Co-Orientadora científica, professora Doutora Célia Antunes, pelo incentivo, atenção, pelos ensinamentos e críticas sempre construtivas.

Quero agradecer à professora Doutora Cristina Pinheiro, por toda a atenção disponibilizada, ensinamentos e ajuda primordial, na realização do estudo.

Agradeço às colegas de laboratório Cátia Barra, Sílvia Arantes e á mestre Lénia Rodrigues, pelo incentivo, apoio e boa disposição indispensável nos dias intermináveis de trabalho laboratorial.

Agradeço as técnicas dos laboratórios de Bioquímica da fase III do Colégio Luis Verney, Sra. Jesuína Mosca, Sra. Anabela, Sra. Aida, Sra. Esperança e Sra. Helena, pela ajuda, prestabilidade, apoio e atenção dispensada.

Por último, mas não menos importante um agradecimento especial ao meu namorado, a todos os meus amigos e colegas académicos, um especial obrigado a Joana Ferreira, Carla Simões, Elisabete da Veiga e a Mirta Santos, pelo apoio, ajuda, carinho e amizade indispensáveis.

Índice

Resumo	viii
Abstract.....	ix
1. Introdução.....	1
1.1. A Saliva.....	1
1.1.1 Características gerais	1
1.1.2 Principais funções.....	3
1.1.3 Composição Proteica da Saliva	4
1.2. O papel da saliva na perceção dos alimentos.....	6
1.3. Variações inter – individuais na sensibilidade gustativa	8
2. Objetivos	11
3. Materiais e Métodos	12
3.1. População em estudo.	12
3.2. Testes de sensibilidade e medição de intensidades.....	12
3.3. Recolha de saliva mista humana.....	14
3.4. Tratamento das amostras de saliva mista humana.....	14
3.5. Quantificação da proteína total nas amostras de saliva mista.....	15
3.6. Determinação da atividade enzimática da α -amilase salivar.....	16
3.6.1. Fundamentos do método do DNS.....	16
3.6.2. Preparação de soluções.....	18
3.6.3. Otimização do método do DNS.....	19
3.6.4. Determinação da atividade enzimática específica da α -amilase salivar nas amostras em estudo.....	20
3.7. Perfil proteico da saliva mista - Eletroforese SDS-PAGE.....	21
3.9. Imunodeteção da proteínas α -amilase salivar e anidrase carbónica VI – Western Blotting.....	23

3.10. Análise estatística dos dados.....	26
4. Resultados	27
4.1. Distribuição dos indivíduos pelos três grupos de sensibilidade gustativa ao PROP.	27
4.2. Avaliação da taxa de secreção e concentração proteica total salivar.....	29
4.3. Determinação da atividade enzimática da α -amilase Salivar.....	31
4.3.1. Otimização do método do DNS para a determinação da atividade enzimática da α -amilase salivar.	31
4.3.2. Determinação da atividade enzimática da α -amilase salivar.....	33
4.4. Análise da expressão das enzimas α -amilase salivar e CA VI.	35
4.4.1 Perfil proteico salivar humano.	35
4.4.2. Avaliação da expressão da α -amilase salivar e da CA VI.....	36
4.3. Análise da expressão da CA VI em indivíduos masculinos.....	39
5. Discussão.....	42
6. Conclusão	48
7. Referências Bibliográficas	50
Anexos.....	55

Índice de figuras

Figura 1. Localização anatômica das glândulas salivares maiores na cavidade oral.	2
Figura 2. Representação gráfica das percentagens das proteínas constituintes da saliva mista humana.	5
Figura 3. Estrutura química do composto amargo 6-n-propil-tiouracilo.	9
Figura 4. A escala de magnitude rotulada oral.	13
Figura 5. Representação gráfica de um exemplar de uma curva de calibração de BSA utilizada no estudo.	15
Figura 6. (A) Reação de oxidação do grupo aldeído pelo reagente DNS; (B) Reação de redução do reagente DNS.	16
Figura 7. Representação gráfica da curva de calibração da Glucose.	17
Figura 8. Representação do espectro na gama de comprimento de onda de absorção do DNS e glucose.	17
Figura 9. Curva utilizada para o cálculo de massas moleculares aparentes a partir do padrão de massas moleculares.	22
Figura 10. Esquema representativo da sandwich utilizada no processo de transferência de proteínas do gel de SDS-PAGE, para a membrana.	24
Figura 11. Exemplo representativo de três gráficos que constituem exemplos representativos de um indivíduo pertencente a cada grupo de sensibilidade gustativa ao PROP.	27
Figura 12. Representação gráfica da distribuição dos indivíduos de acordo com os grupos de sensibilidade e género.	28
Figura 13. Representação gráfica da taxa de secreção salivar dos indivíduos de acordo com os grupos de sensibilidade gustativa ao PROP e género.	29
Figura 14. Representação gráfica dos níveis de proteína total na saliva secretada nos indivíduos de acordo com os grupos de sensibilidade gustativa ao PROP e género.	30
Figura 15. (A) Estudo da linearidade do ensaio enzimático da α -amilase relativamente à concentração de proteína total.	32
Figura 16. Representação gráfica da atividade enzimática da α -amilase salivar nos indivíduos dos diferentes grupos de sensibilidade ao PROP.	34
Figura 17. Perfil proteico salivar de indivíduos masculinos e femininos “ Pouco sensíveis” e “Super sensíveis”.	36

Figura 18. Exemplos representativos de membranas de Western Blotting efetuadas nesse estudo, evidenciando a presença das proteínas, α -amilase e CA VI nas amostras de saliva de indivíduos com diferentes sensibilidades ao PROP.	37
Figura 19. Um gel SDS-PAGE representativo, só com amostras de indivíduos homens dos diferentes grupos de sensibilidade ao PROP.....	39
Figura 20. Exemplo representativo de uma membrana coranda com o corante Comassie, onde é possível visualizar bandas por imunomarcção as bandas de CA VI com diferentes intensidades de expressão em indivíduos masculinos.	40

Índice de tabelas

Tabela I. Percentagem de indivíduos pertencentes a cada um dos grupos de sensibilidade gustativa.	28
Tabela II. Valores de Volumes das bandas de CA-VI identificadas na membrana de Western Bolttig.	38
Tabela III. Valores de volumes (%) da expressão de CA-VI nas várias amostras de salivas pertencentes a indivíduos dos diferentes grupos de sensibilidade ao PROP.	41

Lista de Abreviaturas, Acrónimos

aPRPs	Proteínas ricas em prolina ácida
bPRPs	Proteínas ricas em prolina básica
BSA	Albumina do soro bovino (do inglês “Bovine serum albumin”)
CA-VI	Anidrase carbónica VI
DNS	ácido, 3,5 – Dinitrosalicílico
gPRPs	Glicoproteínas ricas em prolina
HSA	Albumina do soro humano (do inglês “Human serum albumin”)
IgA	Imunoglobulina A
IgC	Imunoglobulina C
IgM	Imunoglobulina M
Ms	Medianamente sensível ao PROP
PDVF	Difluoreto de Polivilideno
Ps	Pouco sensível ao PROP
PROP	<i>6-n-propil-tiouracilo</i> (do inglês “ <i>6-n-propylthiouracil</i> ”)
PSA	Persulfato de Amónio
PTC	Feniltiocarbamida (do inglês “Phenylthiocarbamide”)
SDS	Dodecil-sulfato de sódio (do inglês “Sodium Dodecyl Sulfate”)
Ss	Super sensível ao PROP
SDS-PAGE	Eletroforese dodecil-sulfato de sódio de poliacrilamida (do inglês “Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis”)
sIgA	Imunoglobulina A secretora
TEMED	Tetrametil etilenodiaminico
TBS-T	Tampão Tris salino com Tween (do inglês “Tris-Buffered Saline-Tween”)
Tris	Tris-hidroximetil aminometano

Márcia Andreia Soares Sequeira (2012). **ESTUDO DA RELAÇÃO ENTRE A COMPOSIÇÃO PROTEICA DA SALIVA E A SENSIBILIDADE PARA O GOSTO AMARGO.** Dissertação de Mestrado (Elsa Lamy e C.M. Antunes, orientadores). Escola de Ciências e tecnologias, Universidade de Évora, Évora, Portugal.

Resumo

A diferente sensibilidade para o gosto amargo do PROP (*6-n-propil-tiouracilo*) está associada a fatores genéticos, mas a influência do meio oral, nomeadamente da composição salivar, não é de excluir. Neste trabalho compararam-se as características salivares de indivíduos com diferentes sensibilidades para o PROP. Foi avaliada a secreção salivar, atividade enzimática de α -amilase, pelo método do DNS e expressão de α -amilase e CA-VI, através SDS PAGE e Western blot.

Não se observaram diferenças na taxa de secreção salivar, entre os grupos de sensibilidade diferente. Para a concentração proteica, as mulheres “super sensíveis” apresentam valores superiores. No que diz respeito a proteínas salivares, a atividade enzimática da α -amilase apresentou-se aumentada em mulheres “super sensíveis”. Para a CA VI, observou-se um aumento de expressão apenas em homens “super sensíveis”. Estes resultados sugerem um envolvimento das proteínas estudadas na sensibilidade gustativa, a qual difere entre géneros.

Palavras-chave: α -amilase salivar; anidrase carbónica VI, proteínas salivares; PROP (*6-n-propil-tiouracilo*).

Márcia Andreia Soares Sequeira (2012). **STUDY OF THE RELATIONSHIP BETWEEN THE PROTEIN COMPOSITION OF SALIVA AND SENSITIVITY TO THE BITTER TASTE.** Master dissertation (Elsa Lamy e C.M. Antunes, supervisors). Science and Technology School, University of Évora, Évora, Portugal.

Abstract

The different sensitivity to the bitter taste of PROP (*6-n-propylthiouracil*) compound is associated with genetic factors however, the influence of the oral environment, in particular the salivary composition, cannot be excluded. In this study we compared the characteristics of saliva from individuals with different taste sensitivities to PROP. The salivary secretion, enzyme activity of α -amylase was evaluated using DNS method. α -amylase and CA-VI protein expression was evaluated using SDS PAGE and Western blot.

No differences in the rate of saliva secretion, among groups of different sensitivity were observed. Concerning protein concentration, women supertasters presented higher values. With respect to the salivary proteins, the enzymatic activity of α -amylase appeared increased in women supertasters. For CA-VI there was an increase in expression only in men supertasters comparatively to the other taste sensitivity groups. These results suggest an involvement of proteins studied in taste sensitivity, and a different effect between genders.

Keywords: salivary α -amilase; carbonic anhydrase VI; salivary protein; PROP (*6-n-propylthiouracil*).

1. Introdução

1.1. A Saliva

1.1.1 Características gerais

A saliva é um fluido biológico, segregado na cavidade oral, composto por 99,5% de água, 0,3% de proteínas e 0,2% de compostos inorgânicos, aproximadamente. As proteínas da saliva são principalmente glicoproteínas, enzimas (por exemplo α -amilase e anidrase carbônica), imunoglobinas, albumina, e uma grande variedade de péptidos. Para além das proteínas, a componente orgânica da saliva engloba ainda pequenas quantidades de glucose e produtos nitrogenados, como a ureia e a amónia (Schipper, et al., 2007; Rosa, et al., 2012). A fração inorgânica da saliva é constituída por uma complexa mistura de eletrólitos como, sódio, potássio, cálcio, cloreto, magnésio, bicarbonato e fosfato (Rosa, et al., 2012). A saliva é um fluido com um pH entre 5,6 e 7,6, em indivíduos saudáveis. É produzida em cerca de 90% pelas glândulas salivares maiores, correspondendo os restantes 10% a secreção proveniente de glândulas salivares menores e do fluido crevicular gengival (fluido secretado no sulco gengival) (Chen, 2009).

A quantidade e a composição da saliva segregada são afetadas por vários fatores tais como: taxa de fluxo salivar, ritmo circadiano, tipo e tamanho das glândulas salivares, duração e tipo de estímulo, dieta, drogas, sexo, idade, tipo sanguíneo e estado fisiológico (Schipper, et al., 2007).

A saliva desempenha um papel vital no processamento dos alimentos por via oral, participando na digestão e interferindo na perceção do gosto, e na manutenção da saúde oral. Possui ainda como função, o auxílio na manutenção da saúde oral, contribuindo para a manutenção da integridade dos dentes, tendo atividade antibacteriana e ajudando na lubrificação e proteção da mucosa oral (Chen, 2009).

A saliva é secretada principalmente por três pares de glândulas exócrinas, que constituem as glândulas salivares maiores (parótidas, sublinguais e submandibulares) (figura 1.) e glândulas salivares menores presentes na mucosa da língua (glândulas de Von Ebner), lábios e palato (Schipper, et al., 2007).

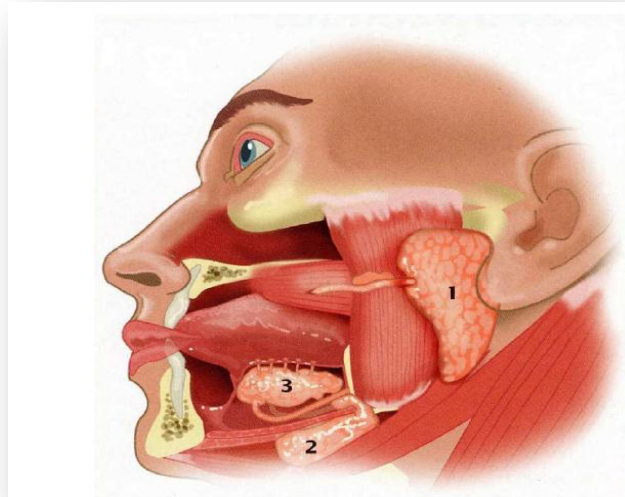


Figura 1. Localização anatômica das glândulas salivares maiores na cavidade oral; 1- Glândula Parótida, 2- Glândula Submandibular, 3- Glândula Sublingual (adaptado de Aps & Martens, 2005).

A denominação “maiores” e “menores” deve-se ao facto das suas dimensões e quantidade de fluido secretado. As glândulas parótidas estão localizadas na proximidade dos primeiros molares superiores. As glândulas sublinguais, estão localizadas na parte central do pavimento oral, e por sua vez a glândulas submandibulares localizam-se em frente e de ambos os lados do pavimento oral (Chen,2009).

As glândulas salivares são compostas por ácinos. Estes ácinos estão ligados por ductos de onde a saliva secretada é drenada para a cavidade oral. Durante esta passagem a concentração iónica da saliva varia, devido ao transporte ativo dos iões, que torna o fluido oral hipotónico em relação ao plasma (Aps & Martens, 2005).

Cada tipo de glândula salivar produz um tipo de secreção: as células acinares que se encontram nas glândulas parótidas e nalgumas glândulas salivares (células acinares serosas), submandibulares, linguais e no palato segregam um fluido praticamente sem muco. Existem também células mucosas presentes nas glândulas submandibulares, sublinguais e no palato que produzem uma secreção viscosa, bastante rica em muco (Schipper, et al., 2007). A secreção salivar humana varia de 0,3 a 7,0 mL de saliva produzida por minuto, e 0,5 a 1,5 L de saliva produzida por dia (Schipper, et al., 2007).

1.1.2 Principais funções

As funções da saliva estão divididas em cinco categorias principais: (1) lubrificação e proteção, (2) ação tampão e atividade antibacteriana, (3) manutenção da integridade dos dentes, (4) reparação tecidual, (5) gosto e digestão (Humphrey & Williamson, 2001).

Como a saliva é um revestimento sero-mucoso, tem como função lubrificar e proteger os tecidos orais. Os principais componentes lubrificantes da saliva são as mucinas, as quais são glicoproteínas de elevado peso molecular (Dodds et al., 2005). As mucinas têm uma baixa solubilidade, elevada elasticidade e viscosidade, e uma forte aderência. Para além do seu papel como lubrificantes, as mucinas salivares têm uma variedade de funções essenciais para a manutenção da defesa e estabilidade oral: desempenham uma função antibacteriana, e controlam a adesão de microrganismos às superfícies, o que contribui para o controlo de colonização bacteriana e fúngica. (Humphrey & Williamson, 2001).

A ação tampão da saliva deve-se principalmente à existência de iões bicarbonato e fosfato, ureia, proteínas anfotéricas e enzimas. O bicarbonato é o principal sistema tampão na cavidade oral, que funciona como neutralizador de ácidos. A ação tampão da saliva funciona de forma mais eficaz quando as taxas de fluxo salivar estimuladas são elevadas, e ineficazmente quando a taxa de fluxo salivar não estimulado é baixa (Humphrey & Williamson, 2001). A elevada quantidade de iões bicarbonato na saliva proveniente da glândula parótida tem uma ação tampão em compostos ácidos, o que modifica a perceção do gosto ácido (Neyraud, et al., 2009).

A saliva possui uma atividade antimicrobiana. Proteínas como IgA, IgG e IgM, sendo imunoglobulinas, protegem os dentes e as superfícies da mucosa (Humphrey & Williamson, 2001). Em relação á manutenção da integridade dentária, a saliva facilita os processos de desmineralização e remineralização. As elevadas concentrações salivares de cálcio e fosfato são responsáveis pela maturação e remineralização dentária (Humphrey & Williamson, 2001).

Para além das funções referidas, a saliva tem uma ação a nível dos processos ingestivos e digestivos, através da sua participação nos processos envolvidos na deteção do gosto e no processo de digestão. No que diz respeito ao gosto, a hipotonia da saliva é apontada como aumentando a capacidade de degustação dos alimentos. Para além disso, a presença de proteínas, nomeadamente da anidrase carbónica VI, também parece estar relacionada com o processo gustativo, sendo esta proteína referida como necessária ao crescimento e maturação dos gomos gustativos (estruturas onde se encontram as células recetoras do gosto) (Humphrey & Williamson, 2001).

1.1.3 Composição Proteica da Saliva

A saliva contém centenas de proteínas, péptidos, hormonas, e outros componentes que podem servir como biomarcadores. As proteínas presentes na cavidade oral, têm várias origens, incluindo glândulas salivares, mucosa oral, plasma sanguíneo, fluido crevicular gengival e microrganismos (Rosa, et al., 2012; Dodds et al., 2005).

Existe uma grande variedade de proteínas salivares, sendo que cerca de 80% das enzimas são segregadas pelas glândulas parótidas e as restantes são segregadas pelas glândulas submandibulares. As glândulas sublinguais, por sua vez segregam uma saliva rica em mucinas. Tal como referido anteriormente, as mucinas são proteínas com elevada importância na composição da saliva, sendo que a maior parte destas proteínas são produzidas pelas glândulas salivares menores (Castagnola, et al., 2011).

As proteínas salivares apresentam uma variedade de funções, 21% das proteínas da saliva estão associadas à imunidade, 1,6% são associadas a proteína de replicação e reparação, 4,8% são associadas à mobilidade celular e secreção, 2,3% estão ligadas à transcrição e ribossomas, 4,2% estão associadas à multiplicação celular e ciclo celular, 9,7% à transdução do sinal, 5,2% associadas ao metabolismo, e 7,1% associadas ao citoesqueleto e às endomembranas (Castagnola, et al., 2011). Existem 28,7% das proteínas salivares das quais não se tem a certeza das suas funções, e 15,4% das proteínas são completamente desconhecidas as suas funções. A maioria destas proteínas tem um elevado nível de prolina (30% - 40%), e são designadas de proteínas ricas em

prolina (PRPs) (figura 2.). As PRPs constituem quase 70% da proteína total contida na saliva, proveniente das glândulas parótidas (Wu et al.,2009).

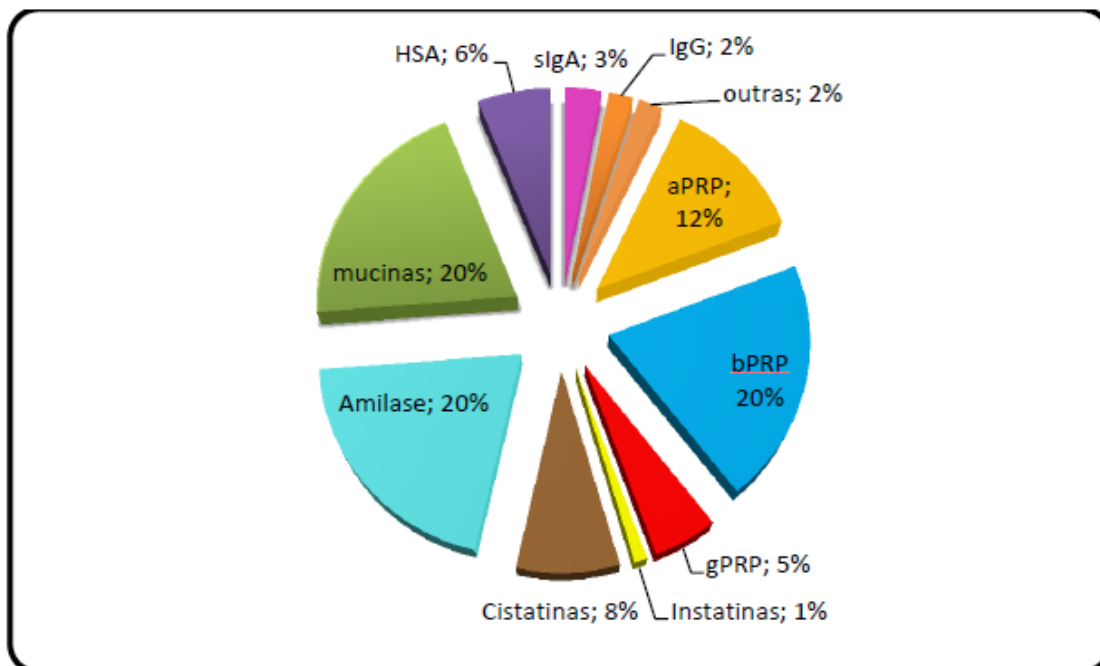


Figura 2. Representação gráfica das percentagens das proteínas constituintes da saliva mista humana (adaptado de Scarano et al, 2010).

As mucinas, são glicoproteínas de elevado peso molecular. Estas proteínas têm um elevado grau de glicosilação e potencial hidratação, tem propriedades viscoelásticas que promovem a lubrificação (Dodds, et al., 2005).

A α -amilase salivar é responsável pela digestão inicial do amido, é um indicador do funcionamento das glândulas salivares, particularmente da glândula parótida, esta glândula contribui com 20% - 30% da proteína total salivar (Castagnola, et al.,2011). Esta enzima tem um papel preponderante na manutenção da saúde oral, e na imunidade da mucosa oral, inibindo a adesão e crescimento de bactérias (Rholeder & Nater, 2009; Out, et al., 2011). Recentemente, a α -amilase salivar tem sido identificada como um possível biomarcador de reatividade ao stress, por parte do sistema nervoso autónomo. Os níveis desta enzima aumentam rapidamente em resposta a condições de stress fisiológico e psicossocial (Amela, et al., 2011)

1.2. O papel da saliva na percepção dos alimentos

Desde a antiguidade que a percepção gustativa é importante para garantir a aquisição de nutrientes e para evitar a ingestão de substâncias tóxicas. Os mamíferos têm a percepção de cinco gostos básicos, o salgado, o doce, o ácido, o amargo e o umami (Reed, et al., 2006). Neste momento já há alguns autores que defendem a gordura como sendo um sexto gosto básico, dada a presença de recetores para ácidos gordos a nível das células recetoras do gosto (Pickering et al., 2004)

Tal como foi referido, a percepção dos alimentos na cavidade oral é influenciada pela saliva. Esta ajuda na dissolução e transporte das moléculas presentes nos alimentos para os locais de receção do gosto (células presentes nos gomos gustativos). As proteínas da saliva interagem com as moléculas presente nos alimentos, modificando-as, moldando a forma como elas são percebidas (Spielman, 1990). A responsabilidade da saliva na percepção gustativa é adaptativa, ou seja, a natureza da resposta é modelada pela natureza do estímulo percebido. Este facto é suportado pela recente descoberta que a proteómica da saliva total, pode ser modificada pela natureza dos compostos provados (Neyraud, et al., 2006).

Alguns estudos apresentam evidências de uma possível influência das proteínas salivares na percepção dos alimentos. Estudos demonstraram que a proteómica salivar pode ser modificado por dietas ricas em taninos (Da Costa, et al., 2008; Lamy et al., 2010). As proteínas ricas em prolina (PRPs) e as histatinas têm sido apontadas como as principais proteínas salivares envolvidas, uma vez que podem ligar e precipitar polifenóis derivados de plantas na cavidade oral, provocando a sensação de adstringência (Williamson, 1994). Também a amílase salivar foi referida como sofrendo alterações em função do consumo de taninos, ainda que o motivo dessas alterações não esteja elucidado (da Costa et al., 2008; Lamy et al., 2010).

A hipótese que a lípase salivar estará envolvida na percepção da gordura, está ligada ao facto da mesma degradar em frações menores os triglicéridos, originando ácidos gordos e gliceróis. (Kawai & Fushiki, 2003).

A saliva proveniente da glândula parótida participa largamente na formação do “bolo” digestivo na cavidade oral, e na sua digestão através da contribuição da α -amilase na hidrólise do amido. Esta proteína pode também contribuir para a percepção gustativa (Neyraud, et al., 2009), através da ação básica do amido nos produtos alimentares, a atividade da α -amilase tem sido ilustrada na percepção do gosto doce (Neyraud, et al., 2006). Evidenciou-se uma variação da quantidade de α -amilase na saliva após uma estimulação com sacarose (Quintana, et al., 2009). A α -amilase salivar (α -1,4- α -D-glucano 4-glucanohidrolase; EC 3.2.1.1) é uma das mais importantes enzimas da saliva, é produzida pelas glândulas salivares e secretada na saliva sob ativação nervosa. É principalmente produzida em 80% pelas glândulas parótidas, havendo uma diminuta produção pelas glândulas submandibulares (Out, et al., 2011). A α -amilase é constituída por duas famílias de isoenzimas, que catalisam a hidrólise das ligações α -1,4, em glucose e em maltose, sendo a principal enzima na digestão do amido e dos carboidratos na cavidade oral. A massa molecular da α -amilase salivar varia entre 55 a 67 kDa (Da Costa, et al., 2008). As concentrações e atividades desta enzima são variáveis devido a diversos fatores como a idade, o sexo, hábitos tabágicos, exercício físico, dieta e fatores psicológicos (Rholeder & Nater, 2009).

Para além destas interações diretas entre proteínas salivares e constituintes alimentares, a composição proteica da saliva pode estar relacionada com alterações gustativas (Kawai & Fushiki, 2003). Por exemplo, Quintana et al. (2009) observaram um decréscimo na expressão de algumas proteínas salivares [Zn- α -2-glicoproteína induzida pela prolactina cistatina SN e anidrase carbónica VI (CA VI)] associado a um decréscimo global da percepção gustativa. É provável que esta enzima desempenhe um papel crucial na função gustativa. A diminuição da secreção salivar de CA VI é associada a redução e disfunção gustativa, bem como do olfato (Padiglia, et al., 2010).

Diversos estudos têm sugerido que a CA VI possa atuar como um fator trófico, promovendo o crescimento e o desenvolvimento das papilas gustativas, e que depende da presença de zinco. De facto, foi observado que o tratamento com zinco melhora a função gustativa de pacientes, normalizando a função gustativa e a morfologia das papilas gustativas em pacientes com défice em CA VI (Padiglia, et al., 2010; Thatcher, et al., 1998).

A CA VI ou gustina, é uma zinco-metaloenzima. Entre as 16 isoformas de anidrases carbônicas, a CA VI é a única isoforma secretada pelas glândulas exócrinas, descrita em mamíferos. A enzima catalisa reações de hidratação reversíveis entre o dióxido de carbono (CO_2) e o íon bicarbonato (HCO_3^-), gerando o próton H^+ (Kimoto, et al., 2006). As anidrases carbônicas operam em três moléculas / íões muito simples, e estão envolvidas numa variedade de processos vitais. Entre esses processos, a regulação do pH, a respiração, a secreção de eletrólitos, a biossíntese de algumas importantes moléculas como a ureia, a glucose, lípidos e pirimidinas, a excreção de ácidos e sais, na carcinogênese, e na sinalização celular (Nishimori, et al., 2007).

A CA VI foi inicialmente identificada por Fernley em 1979 na saliva e glândulas parótidas de ovelha (Nishimori, et al., 2007). A CA VI é secretada pelas células acinares serosas das glândulas parótidas, submandibulares e Von Ebner (Padiglia, et al., 2010). A CA VI ou gustina é um péptido singular com aparente massa molecular de 37 kDa (Thatcher, et al., 1998).

1.3. Variações inter – individuais na sensibilidade gustativa

Pensa-se que a aversão provocada pelo gosto amargo possa servir como meio de prevenir que os mamíferos ingeriram constituintes alimentares prejudiciais. Há uma grande diversidade nas estruturas dos compostos que os seres humanos percebem como gosto amargo. O gosto influencia as escolhas alimentares dos humanos, sendo que o gosto amargo é uma das principais causas de rejeição de alguns vegetais (Dsamou, et al., 2011).

A percepção do gosto amargo varia muito entre os indivíduos, o que levanta questões sobre os mecanismos subjacentes a essa variabilidade. Existem três fatores principais para a variabilidade do gosto amargo: a variação genética específica (variações na sequência dos receptores do gosto), variação genética genérica (por exemplo, a densidade das papilas gustativas) e variações ambientais (dieta, saúde, estado hormonal, e etc.) (Dsamou, et al., 2011).

Existe uma grande diversidade de recetores do gosto amargo, sendo que nem todos ligam os mesmos compostos amargos (Reed, et al., 2006). Os recetores do gosto amargo são expressos na célula recetora gustativa (célula recetora do gosto- TRC), através do complexo de proteína G. Uma vez no interior da célula, os compostos amargos ligam-se ao sistema de sinalização do recetor, resultando a percepção do gosto amargo (Naim, et al., 2002).

Existem diferenças individuais hereditárias, na percepção do gosto amargo, sendo específicas para alguns compostos amargos e para outros não (Snyder, 1931). Nos seres humanos há polimorfismos no gene que codifica o recetor TAC2R38, sendo esses polimorfismos descritos como responsáveis pela capacidade individual de perceber os compostos PTC (*feniltiocarbamida*) e PROP (*6-n-propil-tiouracilo*) (Reed, et al., 2006). Para os humanos a sensibilidade gustativa não é idêntica em todos os indivíduos, o caso mais estudado de variações inter – individuais na sensibilidade gustativa, é a sensibilidade para o gosto amargo do composto PROP (figura 3.), esta característica é utilizada como marcador da sensibilidade gustativa (Bartoshuk., 2000).

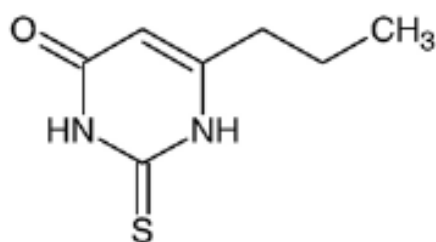


Figura 3. Estrutura química do composto amargo 6-n-propil-tiouracilo (adaptada de Reed, et al., 2006).

O PROP é membro da classe dos compostos amargos pertencentes às tioureias. Todas as tioureias contem o grupo das ligações químicas N–C=S, que é responsável pelo seu gosto amargo. A capacidade gustativa de perceber os compostos PTC/PROP tem sido associado a uma maior sensibilidade para identificar compostos amargos. A maior sensibilidade dos indivíduos que percebem o gosto amargo do PTC/PROP pode ser indicador de maior sensibilidade aos outros quatro gostos básicos (Henderson, et al., 2007).

A ligação gustativa para o PROP é herdada de geração em geração, como uma característica mendeliana recessiva, com os não-sensíveis portadores de dois alelos recessivos (tt), e sensíveis com pelo menos um alelo dominante (Tt) ou (TT) (Zhao, et al., 2003).

Após a caracterização mendeliana para a percepção do gosto amargo do composto PROP, com base no grau de sensibilidade para este composto, propôs-se a existência de três grupos de sensibilidade, em que convencionalmente classificaram-se os indivíduos como pouco ou nada sensíveis (“non-tasters”), medianamente - sensíveis (“médium-tasters”), e super - sensíveis (“super-tasters”), variando o limiar de concentrações do composto (Bartoshuk, et al., 1994). Os três níveis de sensibilidade gustativa, estão fortemente relacionados com as sensibilidades individuais para o gosto amargo dos compostos PTC e PROP e, simultaneamente, com os polimorfismos referidos (Bufe, et al., 2005).

Recentemente a resposta ao gosto do PROP, tem sido associado a uma reduzida preferência por alimentos doces e com elevado teor de gordura, com reduzida adiposidade, índices de massa corporal, e com perfis plasmáticos lipídicos favoráveis. A elevada sensibilidade para o PROP confere proteção á obesidade, ao cancro do colón e as doenças cardíacas coronárias. A predisposição genética da sensibilidade para o PROP, prevê escolhas e hábitos alimentares, mais restritos para o gosto amargo (Henderson, et al.,2007).

Tendo em conta o efeito da saliva nas características do meio oral, é de pensar que a composição proteica dos indivíduos com sensibilidades diferentes possa apresentar diferenças. Assim sendo, o objetivo do presente trabalho é avaliar se existem diferenças a nível da composição proteica da saliva entre indivíduos com sensibilidades gustativas diferentes para o gosto amargo do PROP, mais propriamente verificar se existem alterações ao nível das proteínas α -amilase salivar e CA VI.

2. Objetivos

A percepção gustativa do alimento envolve vários aspetos, tais como a intensidade, a qualidade e o valor hedónico da sensação percetiva. A saliva é o principal fluído constituinte do ambiente exterior das células recetoras do gosto, e como tal, desempenha um papel fundamental na sensibilidade gustativa. A percepção do gosto amargo varia muito entre os indivíduos, desconhecendo-se até á data as causas subjacentes a essa variabilidade.

O objetivo geral inerente a este trabalho foi avaliar possíveis alterações do perfil proteico salivar entre os grupos de indivíduos com diferenças na sensibilidade para o gosto do composto PROP.

Em particular pretendeu-se:

- 1) Avaliar a taxa de secreção e a concentração proteica da saliva nos diferentes indivíduos.
- 2) Determinar a atividade enzimática e expressão da α -amilase salivar, uma das enzimas presente em maior quantidade e considerada uma das mais importantes na cavidade oral.
- 3) Determinar a expressão da CA VI, dado que esta enzima tem sido associada à percepção do gosto amargo.
- 4) Avaliar a existência de diferenças de atividade e / ou expressão da α -amilase salivar e de CA VI entre os indivíduos.
- 5) Estudar eventuais correlações entre os parâmetros bioquímicos salivares e a sensibilidade gustativa individual.

3. Materiais e Métodos

3.1. População em estudo.

Cento e sessenta e oito indivíduos caucasianos da Universidade de Évora com idades compreendidas entre os 18 e 30 anos, aparentemente saudáveis, participaram voluntariamente nos testes de sensibilidade gustativa. Cada indivíduo foi informado verbalmente sobre o procedimento aplicado, e o objetivo do estudo. Foram preenchidos questionários (Anexo I) de modo a aferir acerca da existência de patologias possíveis de afetar a sensibilidade gustativa, e acerca do intervalo de tempo entre a última refeição e os testes. Só foram considerados para posterior análise indivíduos cujo consumo de alimento tivesse sido superior a uma hora. Nestas condições foi analisado um total de cento e trinta e sete indivíduos. Todos os procedimentos de prova, recolha de saliva, e o preenchimento dos questionários, foram realizados no mesmo intervalo de tempo, no período da manhã (entre as 11 horas e as 12 horas).

3.2. Testes de sensibilidade e medição de intensidades.

Com o objetivo de classificar cada indivíduo, de acordo com a sua sensibilidade gustativa ao composto amargo PROP, estes foram submetidos a provas de soluções testes de PROP e NaCl. Estas soluções testes foram preparadas no dia anterior a cada sessão em água mineral de uma marca comercial (marca branca Pingo Doce), tendo sido utilizada para todas as sessões de provas a mesma marca de água mineral comercial. As referidas soluções foram armazenadas a 4°C até à sua utilização. O NaCl foi utilizado como padrão, pois a intensidade ao gosto de NaCl, não se altera tanto entre os diferentes indivíduos. O teste de sensibilidade ao PROP, consistiu na prova de três soluções de PROP, de concentrações conhecidas e compreendidas entre, 0,032 mmol/L, 0,32 mmol/L, e 3,2 mmol/L, e na prova de três soluções de NaCl de concentrações de 0,01mol/L, 0,1mol/L, e 1,0 mol/L, de modo semelhante ao descrito em Tepper et al., (2001).

Para se proceder a classificação dos indivíduos em função da sua sensibilidade, em cada sessão foram dadas a provar aleatoriamente, as três soluções de PROP e NaCl referidas (devidamente identificadas com códigos). Cada indivíduo provou as soluções uma única vez. A prova de cada solução foi seguida de uma lavagem oral com água mineral. Foi pedido a cada indivíduo que registasse a percepção da intensidade do gosto de cada solução numa escala de magnitude rotulada (figura 4.) (Green et al., 1993).

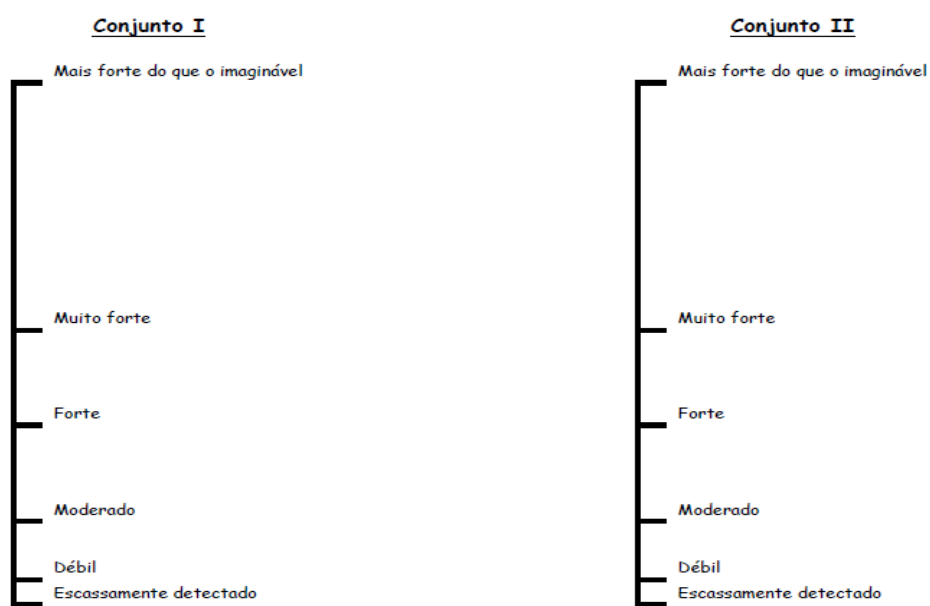


Figura 4. A escala de magnitude rotulada oral (Green et al., 1993).

Cada indivíduo esperou cerca de 30 segundos entre as provas de cada solução. Com uma régua milimétrica efetuou-se a medição de cada intensidade marcada na escala. Com estes valores foram obtidos gráficos que permitiram estabelecer grupos de sensibilidade, de acordo, com o descrito por Tepper et al., (2001).

Indivíduos que avaliaram e perceberam as soluções de NaCl com maior intensidade do que as soluções de PROP foram classificados como “pouco sensíveis” (“non – taster”), indivíduos que classificaram as intensidades, as soluções de NaCl e PROP de igual forma, foram classificados de “medianamente sensíveis” (“médium – taster”), e os indivíduos que classificaram com maior intensidade as soluções de PROP em relação às soluções de NaCl, foram classificados de “super sensíveis” (“super – taster”).

3.3. Recolha de saliva mista humana.

Para a recolha de saliva dos voluntários relatou-se aos indivíduos todas as condições inerentes necessárias ao procedimento e o objetivo do estudo. A recolha da saliva mista foi realizada após efetuados os testes de sensibilidade. Foi pedido aos voluntários que lavassem a boca com água mineral, com o objetivo de eliminar os vestígios de saliva e das soluções do teste de sensibilidade.

Após a lavagem, toda a saliva produzida sem estímulo num período de cinco minutos foi recolhida para frascos estéreis devidamente identificados e mantidos em gelo. Em seguida pesou-se e tarou-se os frascos, para posterior determinação da taxa de secreção salivar de cada indivíduo. Sendo a saliva constituída por 99,9% de água (Chen, 2009), considerou-se uma densidade de 1 g/cm^3 . Após a pesagem da saliva toda a amostra de cada indivíduo, foi transferida para eppendorfs devidamente identificados e mantidos em gelo. Por ultimo as amostras de saliva foram armazenadas a -80°C até posterior análise laboratorial.

3.4. Tratamento das amostras de saliva mista humana.

Pela viscosidade ser uma das características intrínsecas á saliva mista humana, devido a presença principalmente das mucinas (maioritariamente glicoproteínas de elevada massa molecular), as amostras de saliva foram descongeladas em gelo, e de seguida centrifugadas a $13000g$ durante 30 minutos a 4°C , recolhendo-se o sobrenadante e, rejeitando-se o precipitado. Desta forma foi recolhido o sobrenadante homogéneo (Simões C., 2011). O mesmo foi dividido em alíquotas devidamente identificadas, para evitar ciclos de congelação / descongelação, com o objetivo de minimizar a ocorrência de proteólise nas amostras de saliva.

3.5. Quantificação da proteína total nas amostras de saliva mista.

Para a quantificação proteica da saliva mista recorreu-se ao método de Bradford (Bradford, 1976), através da utilização do reagente Bio – Rad Protein Assay. O método baseia-se na alteração da absorvância do corante de ligação *Coomassie Brilliant Blue G-250*, em meio ácido, em que a sua coloração avermelhada converte-se numa cor azulada quando ligado a proteína. A partir de uma “solução-mãe” de BSA com concentração de 2 mg/mL, foram realizadas 7 diluições com água ultra - pura (milliQ), para obtenção de concentrações de 25, 50, 75, 150, 200, 350, 500 µg/mL de BSA. Juntamente com o valor do branco (água ultra - pura), os valores de absorvância para estas concentrações foram utilizados, para traçar as curvas de calibração. Para cada microplaca traçou-se uma curva de calibração (figura 5.).

Prepararam-se diluições sucessivas das amostras de saliva de 2x, 4x, 8x, 16x, sempre mantidas em gelo. Aplicou-se nos poços da microplaca, 10 µL de cada solução (branco, soluções de BSA, e diluições das amostras de saliva), em triplicado. Preparou-se o reagente corante *Coomassie Brilliant Blue G-250* em água bi-distilada (1:4), de acordo com as recomendações do fabricante. Em seguida adicionou-se em 200µL do reagente corante preparado em cada poço, e após um tempo de espera de cinco minutos, fez-se de imediato a leitura da absorvância de cada microplaca a um comprimento de onda de 630 nm, num leitor de microplacas (Microplate reader, Biotek, ELX 800).

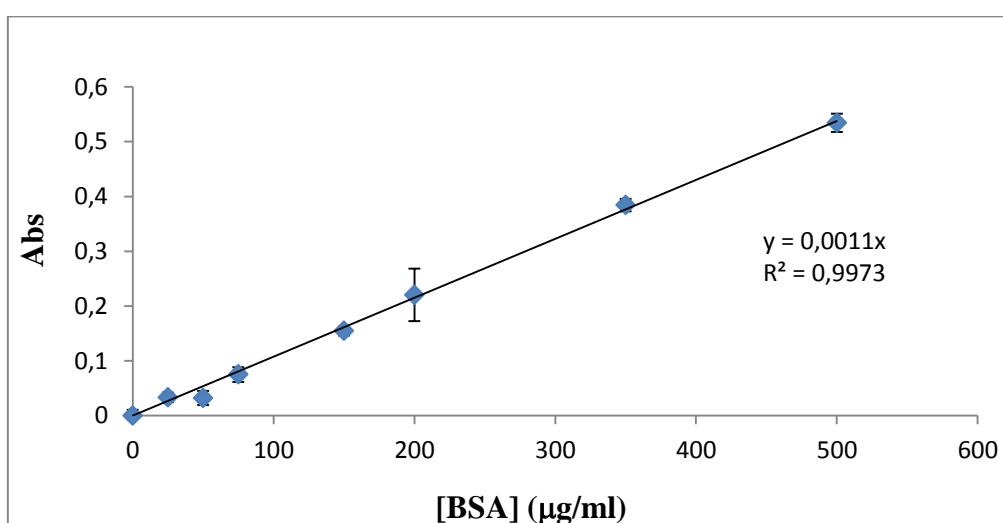


Figura 5. Representação gráfica de um exemplar de uma curva de calibração de BSA utilizada no estudo.

Por interpolação gráfica da reta de calibração (figura 5.), de cada uma das placas, e tendo em conta os fatores de diluição, foi calculada a quantidade de proteína expressa ($\mu\text{g/mL}$), para cada amostra de saliva.

3.6. Determinação da atividade enzimática da α -amilase salivar.

3.6.1. Fundamentos do método do DNS.

De forma a determinar a atividade enzimática da α -amilase salivar, recorreu-se a um método colorimétrico de determinação enzimática. Utilizou-se o reagente, ácido, 3,5 - Dinitrosalicílico (DNS), para a quantificação de açúcares redutores (Miller, 1957). Este método testa a presença do grupo carbonilo ($\text{C}=\text{O}$), encontrado nos açúcares redutores. Na presença de DNS, e com aquecimento (100°C), ocorre a oxidação do grupo funcional aldeído, que está presente na glucose, a grupo carboxilo. Ao mesmo tempo o DNS, é reduzido a ácido 3 - amino, 5 - nitrosalicílico, sob condições alcalinas (figura 6.). Na forma reduzida o DNS fica com cor avermelhada (Anexo II). Assim, a intensidade de cor que se forma é proporcional à quantidade de glucose presente (figura 7.).

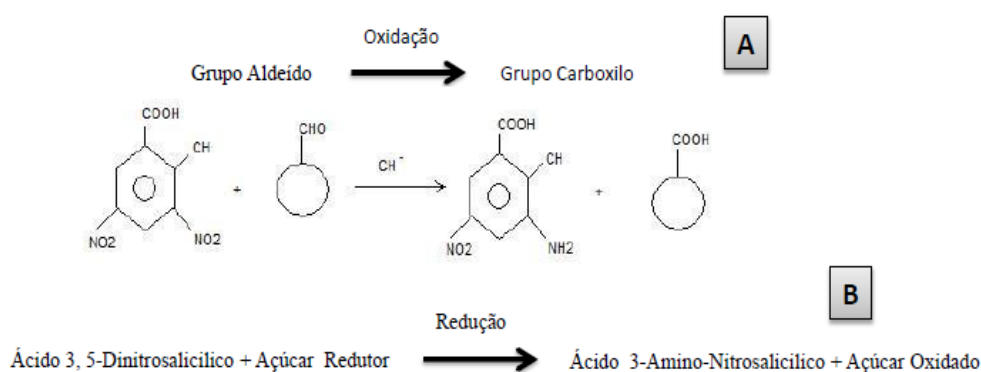


Figura 6. (A) Reação de oxidação do grupo aldeído pelo reagente DNS; (B) Reação de redução do reagente DNS (adaptado de <http://www.eng.umd.edu/~nsw/ench485/lab4a.htm> com base em Miller, 1959).

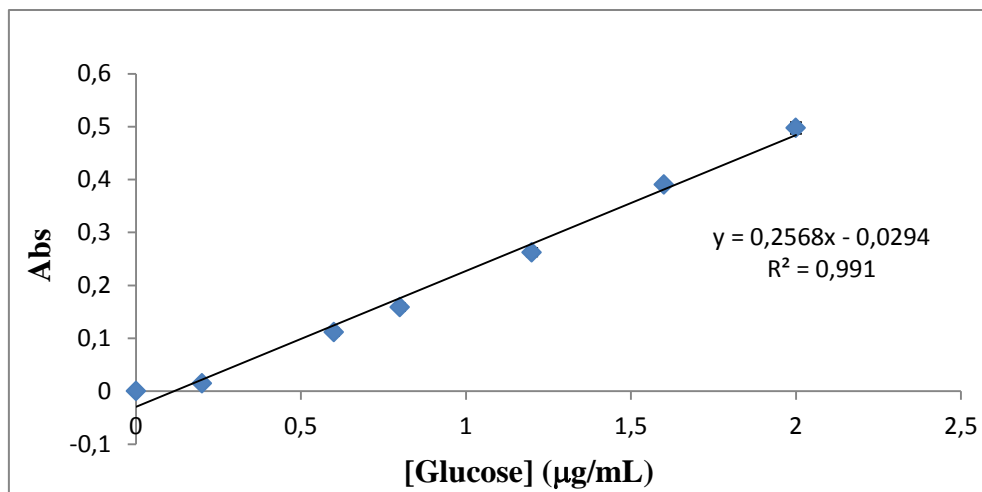


Figura 7. Representação gráfica da curva de calibração da Glucose.

O DNS é um composto que absorve na gama de comprimentos de onda entre $\lambda = 490$ nm aos $\lambda = 580$ nm (Wood, et al., 2012). No presente trabalho as leituras foram feitas a 530nm, por se ter verificado corresponder à zona onde existe maior diferença entre a absorvância do DNS, e do DNS reduzido (figura 8.).

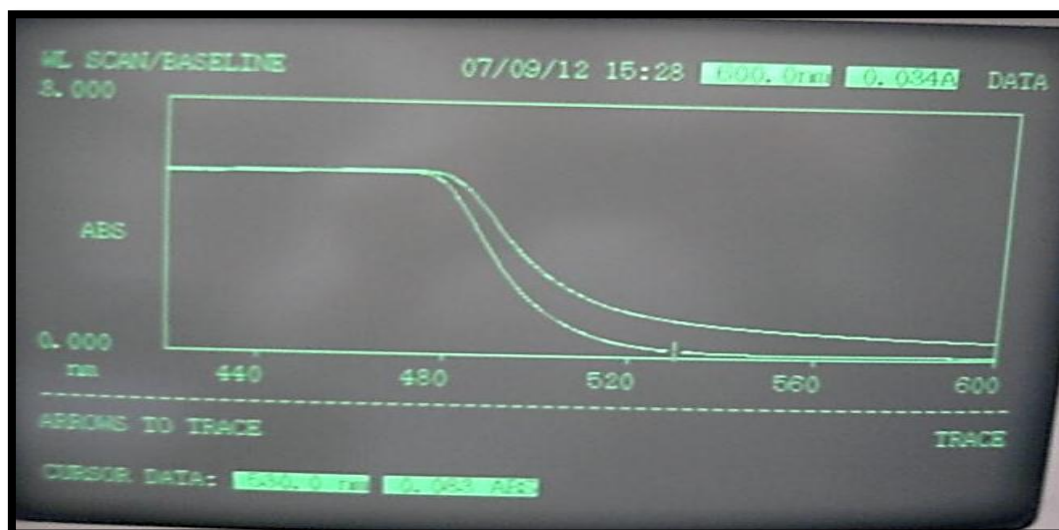


Figura 8. Representação do espectro na gama de comprimento de onda de absorção do DNS e glucose.

3.6.2. Preparação de soluções.

Solução Tampão Fosfato de Potássio 20mM (pH 7.0).

Preparou-se 200 mL de uma solução de K_2HPO_4 40 mM e 200 mL de uma solução de KH_2PO_4 40mM. Para obter-se 100 mL da solução tampão pretendida a pH 7.0, misturou-se 61,5 mL da solução de K_2HPO_4 40mM com 38,5 mL da solução de KH_2PO_4 40 mM.

Solução de Amido 1%.

Dissolveu-se 1g de amido em 100 mL de água bi-destilada, aqueceu-se a 100°C, até a sua total dissolução.

Solução de NaOH 1%.

Dissolveu-se, 1g de NaOH em 100 mL de água bi-destilada, agitando-se até a sua total dissolução.

Solução de DNS.

Dissolveu-se, agitando-se, 1g de DNS, 0,2g de fenol cristalino, em 100mL de uma solução de NaOH 1%, guardou-se a 4°C. Pelo facto do sulfito de sódio se deteriorar ao fim de aproximadamente quatro horas (Miller, 1957), na altura da utilização, para cada 10 mL de solução de DNS adicionaram-se 0,05 g desse reagente. Para melhor segurança do operador, esta solução foi preparada com a devida precaução e cuidado, com o auxílio de luvas, a quando da manipulação dos reagentes, e na hotte, já que o fenol cristalino é um reagente neurotóxico.

Solução de Tartarato de Sódio e Potássio 40%.

Dissolveram-se, 40g do reagente tartarato de sódio e potássio em 100 mL de água bi-destilada, agitando-se até a sua total dissolução.

3.6.3. Otimização do método do DNS.

De forma a otimizar o método do DNS para a aplicação às amostras de saliva em estudo, inicialmente traçou-se a curva de calibração da glucose (concentração de glucose em função da absorvância medida a 530 nm). Foram feitas diferentes diluições a partir de uma solução-mãe de glucose com 2,0 mg/ml. Através destas diluições obtiveram-se concentrações entre 0,2; 0,6; 0,8; 1,2; 1,6 e 2,0 mg/mL., as quais foram utilizadas para traçar a curva de calibração. A leitura das absorvâncias foi efetuada num espectrofotómetro de absorção atómica (Hitachi – U-200) a um comprimento de onda (λ) de 530 nm. Neste passo da otimização foram utilizadas quatro amostras de saliva mista humana, não pertencentes ao estudo.

O reagente DNS para se juntar a amostra foi preparado de acordo com o descrito anteriormente. O protocolo para a determinação da atividade enzimática de amílase consiste em adicionar a cada tudo de ensaio 100 μ L do tampão fosfato de potássio 20 mM pH 7.0, 100 μ L de solução de amido 1% e 50 μ L de amostra (ou água bi-destilada, no caso do branco). Os tubos foram posteriormente colocados a 37°C, num banho com agitação (Selecta – unitronic 32OOR). De modo a aferir qual o tempo de incubação mais adequado para as amostras em estudo, foram testados tempos de 5, 10, 15, 20, 25, e 30 minutos, para as diluições de amostras de saliva 100x e 200x. A seguir a este passo, foram adicionados 100 μ L de solução de DNS a cada tubo de ensaio. Os mesmos foram retirados do banho, agitados num vortéx (Labinco – L46) e colocados em gelo por instantes. Em seguida os tubos foram incubados a uma temperatura de 100°C, num banho aquecido através de uma placa de aquecimento (até a ebulição) durante cinco minutos, sendo posteriormente passados para gelo, onde permaneceram durante dois a três minutos. Adicionou-se à mistura 208 μ L de solução de tartarato de sódio e potássio 40% e 900 μ L de bi-destilada. Por último leu-se a variação da absorvância a $\lambda = 530$ nm.

De acordo com este procedimento, conclui-se que o tempo mais de adequado para incubação a 37°C seria de 20 minutos, pelo que este passou a ser o tempo utilizado com todas as amostras. Construiu-se a curva de calibração.

De modo a determinar os valores de concentração proteica da saliva mais adequados para a determinação da atividade enzimática da amílase, foram testadas diversas concentrações das “amostras-teste” (5,0; 6,0; 7,5; 8,0; e 10 µg/ml). Cada concentração de cada amostra, foi testada em triplicados.

3.6.4. Determinação da atividade enzimática específica da α -amilase salivar nas amostras em estudo.

Inicialmente foi traçada uma curva de calibração de glucose, utilizando as seguintes concentrações: 0; 0,2; 0,6; 0,8; 1,2; 1,6; 2,0; 2,2; 2,6; 2,8; 3,2; 3,6; 4,0; 4,2; 4,6; 4,8; e 5,0 mg/mL. As mesmas foram obtidas por diluições, com água bi-destilada, a partir de uma solução de concentração 5,0 mg/mL. O procedimento seguido foi o mesmo que descrito no ponto anterior, só que nas amostras foram adicionados 50µL de cada uma destas soluções. Cada concentração foi sempre testada em triplicado. Por último leu-se a variação da absorvância a $\lambda = 530$ nm, já com o branco descontado ao valor de absorvância de cada diluição. Construiu-se a curva de calibração.

O mesmo procedimento foi usado para as amostras de saliva mista do estudo. As amostras foram descongeladas em gelo, e preparadas diluições para as concentrações de 5,0; 7,5 e 10 µg/mL de proteína (concentrações para as quais foi observada linearidade, conforme apresentado na secção de resultados) [Figura 14. (A)]. Estas concentrações foram aplicadas para todas as amostras de saliva. Leu-se a alteração de absorvância de cada amostra a $\lambda = 530$ nm. A atividade enzimática específica da α -amilase salivar, foi determinada através de interpolação gráfica, relacionado a concentração proteica de cada amostra, com a curva de calibração de glucose.

3.7. Perfil proteico da saliva mista - Eletroforese SDS-PAGE.

Para comparação dos perfis proteicos, as proteínas salivares foram separadas por eletroforese SDS-PAGE (*dodecil-sulfato de sódio de poliacrilamida*). Calculou-se o volume da amostra a aplicar em cada poço, de modo a ter uma quantidade de 7,5 µg de proteína em cada leine. Adicionou-se a cada amostra, tampão de amostra (0,125M Tris-HCL, pH 6,8, SDS 1% (m/v), 2-mercaptoetanol 5%, glicerol 20% e uma quantidade vestigial de azul de bromofenol). Incubou-se a 95°C durante cinco minutos, em banho seco (Grant – QBT2). Findo este tempo as amostras foram imediatamente colocadas em gelo. Cada amostra foi aplicada num poço de um gel de poliacrilamida (8 x 10 cm e 1 mm de espessura): gel de resolução 12% (T/C), [5 mL de Tris-HCL 1,5M, pH 8,8, 200 µL de SDS, 8 mL de acrilamida / bis – acrilamida 30% (m/v), 6,8 mL de água bi-destilada, 150 µL de PSA (Persulfato de amónio), 0,1g/mL e 10 µL de TEMED]; gel de concentração 4% (T/C) [2 mL de Tris-HCL 0,5M, pH 6,8, 80 µL de SDS, 4,86 mL de água bi-destilada, 1,06 mL de acrilamida / bis – acrilamida 30%, 4,8 µL de PSA e 8,8 µL de TEMED].

Cada uma destas soluções foi colocada cuidadosamente na placas de vidro, de modo a evitar criar bolhas, até 1cm abaixo do topo do vidro. Primeiro colocou-se a solução do gel de resolução, e em seguida adicionou-se água bi-destilada sobre o gel de resolução de modo a evitar o contacto da mistura com o ar. A mistura ficou polimerizada ao fim de 30 – 40 minutos. Removeu-se a água. Em seguida colocou-se a mistura do gel de concentração e encaixaram-se os pentes para posterior formação dos poços após a polimerização. Retiraram-se os pentes dos géis, e colocaram-se estes na tina (sistema Protean mini da Bio – Rad).

Para realização da corrida eletroforética as camaras superior e inferior da tina foram cheias até ao topo com tampão de corrida (0,025M Tris, 0,192M glicina, 1% (m/v) SDS). Aplicou-se num dos poços de cada um dos géis 5 µL do marcador de massas moleculares (Dual Color da Bio. Rad, Ref. 161 – 0324). As proteínas foram separadas a uma voltagem de 140V (60 mA, 15 Watts). A corrida foi interrompida quando a frente de corrida atingiu o final de cada gel. Após o fim da corrida eletroforética, os géis, foram corados com uma solução [Comassie Brilhante Blue R – 250 0,5%, metanol 45% (v/v), e ácido acético 10% (v/v)], durante duas horas. Os foram descorados várias vezes

numa solução de metanol 20% (v/v) e ácido acético 10% (v/v), até que as bandas ficassem bem visíveis. As imagens dos géis foram obtidas através de digitalização no scanner (ScnaJet 3400C HP). A análise das imagens foi feita com recurso ao software TotalLab Quant. Este software possibilita a análise do volume relativo das bandas (Anexo V), corrigindo pequenas diferenças existentes entre as quantidades de proteína corridas em cada leine e permitindo, assim uma mais correta comparação intra- e inter-membranas, minimizando erros devido a alguma variabilidade inerente à técnica. De modo a verificar se existem diferenças na expressão proteica das diferentes amostras, foi comparado a percentagem de volume das bandas, calculada no programa TotalLab Quant, não só entre as várias amostras aplicadas no mesmo gel, como também entre as várias amostras aplicadas nos diferentes géis (Anexo IV).

Para o cálculo das massas moleculares aparentes mediu-se, à distância de cada uma das bandas do marcador à frente de corrida desta. Foi traçado um gráfico com as distâncias percorridas em função das massas moleculares das proteínas constituintes do marcador. Através da curva obtida (figura 9), por interpolação gráfica, foram calculadas as massas moleculares aparentes das bandas observadas nos géis SDS-PAGE.

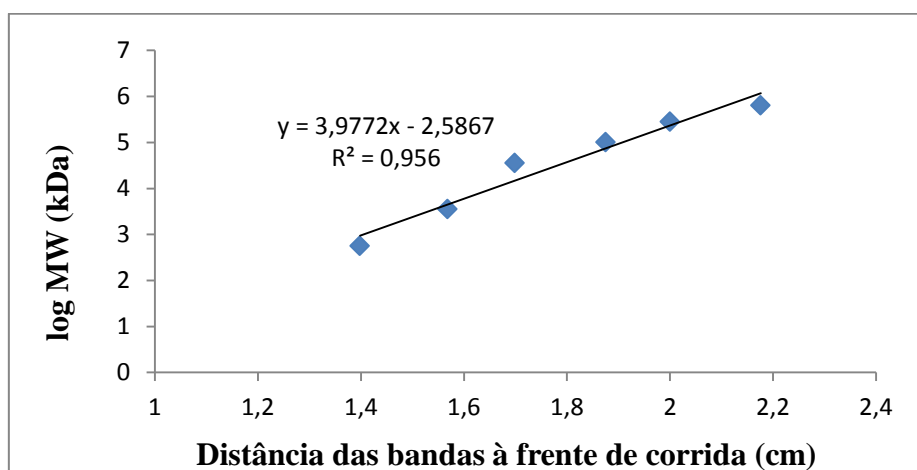


Figura 9. Curva utilizada para o cálculo de massas moleculares aparentes a partir do padrão de massas moleculares.

3.9. Imunodeteção da proteínas α -amilase salivar e anidrase carbónica VI – Western Blotting.

A técnica de western blot consiste na deteção, através da utilização de anticorpos, da proteína em interesse. Para a realização desta técnica, inicialmente procedeu-se a separação proteica por eletroforese SDS-PAGE, como descrito no ponto anterior, apenas com ligeiras alterações: géis com dimensões de 8 x 10 cm e 0,75 mm de espessura; 3 μ g de proteína/leine. Terminada a corrida eletroforética iniciou-se a transferência das proteínas para uma membrana de PDVF (difluoreto de polivilideno). Ativaram-se as membranas de PDVF numa solução de metanol puro, durante cinco minutos. Em seguida lavaram-se as membranas em água bi-destilada durante cinco minutos. Para posterior identificação da membrana correspondente a cada gel, efetuou-se um pequeno corte no canto superior direito, de forma diferenciada.

Após a lavagem em água, colocaram-se as membranas numa tina submersas em tampão de transferência (Tris-HCL 25mM, pH 8,3, glicina 192 mM, metanol 20%, SDS 0,037% (m/v), juntamente com os géis correspondentes. O principal objetivo deste passo era conseguir uma maior afinidade das proteínas do gel para a membrana. Mergulharam-se as quatro folhas de papel de filtro cortadas à medida das membranas e dos géis, quatro placas de fibra e duas cassetes do sistema de transferência, durante quinze minutos. Procedeu-se à preparação da sandwich para as duas membranas na seguinte ordem: por cima de uma das superfícies internas de uma das cassetes, colocou-se uma placa de fibra humedecida pelo tampão de transferência, de seguida um papel de filtro humedecido e por ultimo a segunda placa de fibra humedecida (Figura 9.). Antes do fecho da cassette, verificou-se e eliminou-se a existência de bolhas de ar que pudessem diminuir o contacto entre o gel e a membrana.

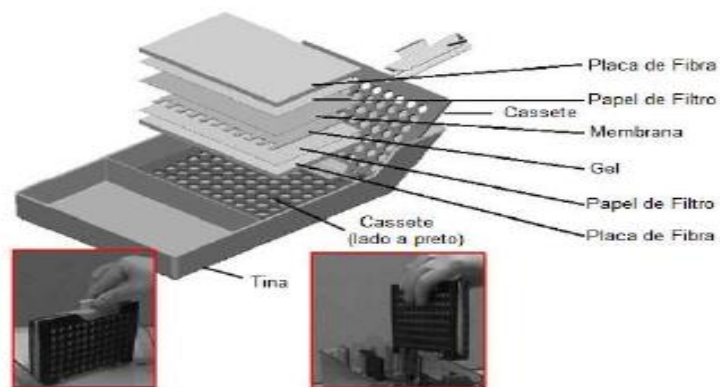


Figura 10. Esquema representativo da sandwich utilizada no processo de transferência de proteínas do gel de SDS-PAGE, para a membrana. (Adaptado de http://stanxterm.aecom.yu.edu/wiki/index.php?page=Western_blotting com base em Patnaik., 2004).

Em seguida colocou-se as cassetes, um agitador magnético, e uma unidade de arrefecimento no reservatório da transferência, enchendo-se o reservatório com solução tampão de transferência, até ao topo. A transferência ocorreu numa amperagem constante de 350 mA (150V, 40Watts) durante uma hora. Durante a transferência preparou-se uma solução de Ponceau S (0,2g de reagente de Ponceau S dissolvido numa solução de 3% (v/v) de ácido acético. No final da transferência, as membranas foram colocadas na solução de Ponceau S durante quinze minutos, com uma suave agitação. Em seguida as membranas foram sujeitas a várias lavagens por água bi-distilada. Esta coloração Ponceau S, teve como objetivo visualizar as bandas proteicas nas membranas e confirmar o sucesso da transferência.

As membranas foram cortadas um pouco abaixo da banda do marcador molecular correspondente a 50 kDa, de modo a separar a porção do gel que contém a α -amilase da porção que contém a anidrase carbónica VI. Por vezes uma das partes da membrana é corada com o reagente corante azul de comassie, e a parte da membrana com as bandas correspondentes as massas moleculares da proteína de interesse para o estudo foi incubada com o anticorpo. A membrana corada será sujeita a posterior análise, quando comparada, com a membrana correspondente que tenha expressa a proteína CA-VI, é feita a comparação das intensidades de marcação do anticorpo, com a intensidade total das proteínas observadas na membrana corada com comassie.

Para parte das membranas, as duas porções da membrana seguiram os restantes procedimentos conducentes a marcação com anticorpos para α -amilase e para anidrase carbónica VI. No caso de algumas, só a parte respeitante à banda de anidrase carbónica VI foi usada para o western blot, tendo a outra parte sido corada com Comassie, de modo a poder fazer uma análise posterior em que existisse um controlo da quantidade de proteína corrida por leine.

No caso das membranas usadas para marcação com anticorpo primário, foram colocadas na solução de bloqueio [5% (m/v) de leite magro em pó em 100mL de TBS-T 1%] durante duas horas, à temperatura ambiente, com suave agitação. Seguidamente as membranas, foram incubadas nas respetivas soluções de anticorpos primários, [anti-ratinho, anti-amilase (Sc 46657, Santa Cruz Biotechnology), e anti-coelho, anti-CA VI (Sc 99173, Santa Cruz Biotechnology)], preparadas numa diluição de 1:200. A incubação com anticorpo primário foi feita *overnight* a 4°C com uma suave agitação. De seguida as membranas foram sujeitas a três lavagens com uma solução de lavagem de 0,5% (m/v) de leite magro em pó dissolvido em 200mL de TBST-T 1%, cada uma com duração de quinze minutos. As lavagens foram efetuadas com uma ligeira agitação. De seguida fez-se a incubação das membranas no anticorpo secundário [anti-ratinho, anti-amilase (GE Healthcare, UK)), e anti-coelho, anti-CA VI (GE Healthcare UK)]. Estas soluções de anticorpo secundário foram preparadas com uma diluição de 1:10000. A incubação no anticorpo secundário durou duas horas, à temperatura ambiente, seguida de três lavagens de quinze minutos cada, com a solução de lavagem.

Por último procedeu-se a revelação das membranas. Retiraram-se as membranas da solução de lavagem e secou-se em papel de filtro. Colocou-se a membrana em contacto com o substrato (reagente quimiofluorescente, fosfatase alcalina), através da sua aplicação, em gotas justapostas numa placa de plástico. Para a revelação das membranas correspondentes à marcação da proteína α -amilase, deixou-se a membrana em contacto com o substrato durante 20 segundos. Para a revelação das membranas correspondentes a marcação da proteína CA-VI, deixou-se a membrana em contacto com o substrato durante 1:30 a 2 minutos. Retirou-se o excesso de substrato através de papel de filtro. Marcou-se as bandas visíveis na membrana dos marcadores moleculares com uma caneta fluorescente. A aquisição das imagens das membranas foi obtida através de um transiluminador (Bio – Rad).

A análise das imagens adquiridas foi feita com o recurso ao Software Quantity-one (Bio – Rad), tendo-se comparado os volumes das bandas marcadas.

3.10. Análise estatística dos dados

Todos os dados foram analisados para a normalidade (teste Kolmogorov-Sminorff) e homocedaticidade (teste Levene). Foi feita uma GLM (general linear model) ANOVA para comparar as diferenças entre grupos de sensibilidade e géneros, para os parâmetros: taxa de secreção salivar, concentração em proteína total, quantidade de proteína/minuto e atividade de amílase. As diferenças foram consideradas para um intervalo de confiança de 95%. A análise estatística foi efetuada com recurso ao software NCSS 2001. Os dados relativos à percentagem de volume das bandas dos géis corados com CBB-R250 apresentavam distribuição normal, tendo as diferenças entre os diferentes grupos sido analisada através de one-way ANOVA.

No que diz respeito às membranas imunomarcadas com os anticorpos de interesse, foi feita uma comparação de percentagem de volumes entre os indivíduos de cada membrana individual, dada a variação que pode existir de membrana para membrana. Uma vez que, neste caso, não foi possível uma análise estatística, foi calculada a frequência com que os indivíduos de cada um dos grupos apresentavam o mesmo padrão.

4. Resultados

4.1. Distribuição dos indivíduos pelos três grupos de sensibilidade gustativa ao PROP.

Após as provas das soluções-teste do composto PROP e NaCl, por parte dos cento de sessenta e oito indivíduos caucasianos com idades compreendidas entre os 18 e 30 anos, foram considerados para posterior análise no presente trabalho, cento e trinta e sete, cujo consumo de alimento tivesse sido superior a uma hora.

De acordo com a determinação do grau da sensibilidade aos compostos PROP e NaCl para cada indivíduo, estabeleceu-se grupos de sensibilidade e incluiu-se cada indivíduo no respetivo grupo, “Pouco sensível”, “Medianamente sensível” e “Super sensível” (Figura 10.)

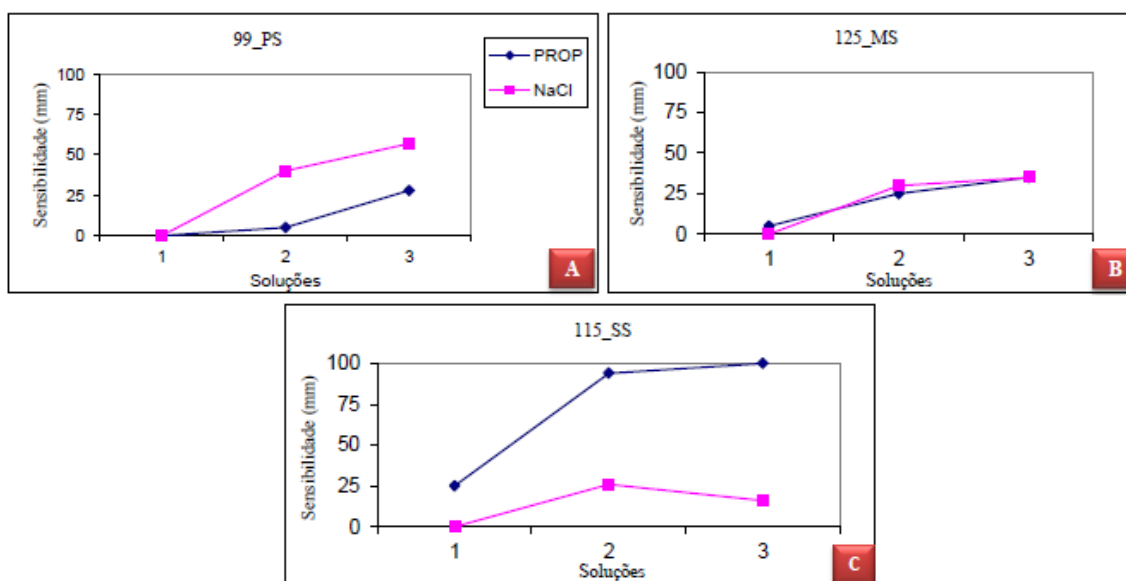


Figura 11. Exemplo representativo de três gráficos que constituem exemplos representativos de um indivíduo pertencente a cada grupo de sensibilidade gustativa ao PROP. (A), (B), (C) representam o indivíduo “Pouco sensível” (PS), “Medianamente sensível” (MS), e “Super sensível” (SS) respetivamente. As soluções-teste 1,2 e 3 representam as soluções de 0,032; 0,32; e 3,2 [mmol/L] de PROP e de 0,01; 0,1; 1,0 [mol/L] de NaCl respetivamente.

Constatou-se uma distribuição equivalente entre os indivíduos pelos três grupos de sensibilidade, em que 28,5% dos 137 indivíduos analisados pertencem ao grupo dos “Poucos sensíveis”, 35,04% dos indivíduos pertencem ao grupo dos “Medianamente sensíveis” e 36,5% dos indivíduos analisados considerou-se serem “Super sensíveis” (tabela I. e figura 12.).

Tabela I. Percentagem de indivíduos pertencentes a cada um dos grupos de sensibilidade gustativa.

Percentagem de Indivíduos (%)			
	Pouco Sensíveis	Medianamente Sensíveis	Super Sensíveis
Total de Indivíduos	28,5	35,0	36,5
Sexo Masculino	35,7	27,1	37,1
Sexo Feminino	20,9	43,3	35,8

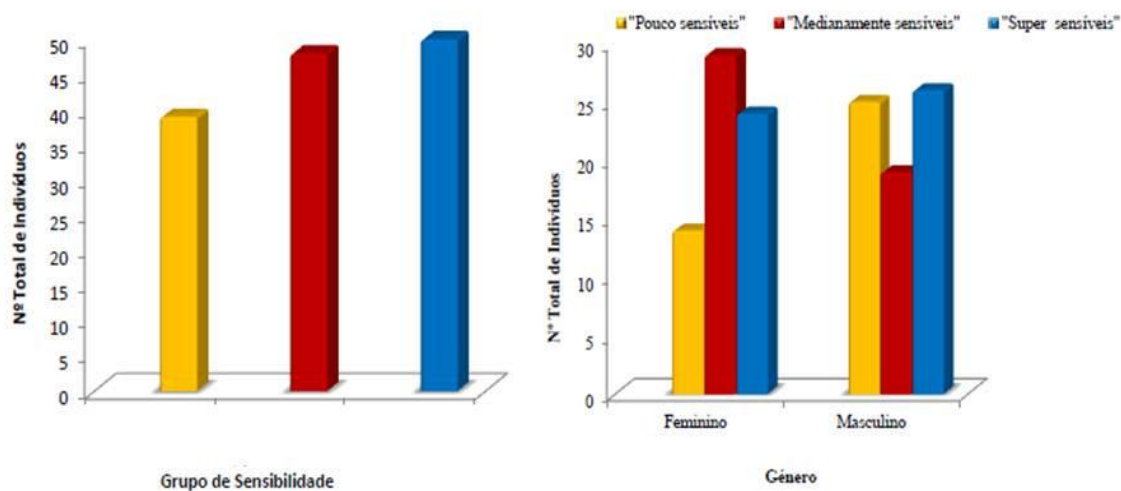


Figura 12. Representação gráfica da distribuição dos indivíduos de acordo com os grupos de sensibilidade e género.

Verifica-se que as mulheres são mais sensíveis ao gosto amargo do PROP que os homens, pois o género feminino possui uma baixa percentagem de indivíduos “pouco sensíveis” ao PROP. Existe também um maior número de mulheres “medianamente sensíveis” comparativamente a mulheres “pouco sensíveis” é praticamente o dobro, bem como em comparação com os homens “medianamente sensíveis”.

4.2. Avaliação da taxa de secreção e concentração proteica total salivar.

A saliva recolhida durante cinco minutos sem tempos de espera ou qualquer estimulação, permitiu entre outros parâmetros, calcular a taxa de secreção salivar da saliva mista humana por minuto (figura 13.). De acordo com a análise estatística e comparando a taxa de secreção salivar de todos os indivíduos em estudo, não se observaram diferenças significativas entre as taxas de secreção salivar entre os indivíduos de grupos de sensibilidade diferentes, e entre homens e mulheres. Não existe uma correlação entre a taxa de secreção salivar e a sensibilidade ao composto PROP.

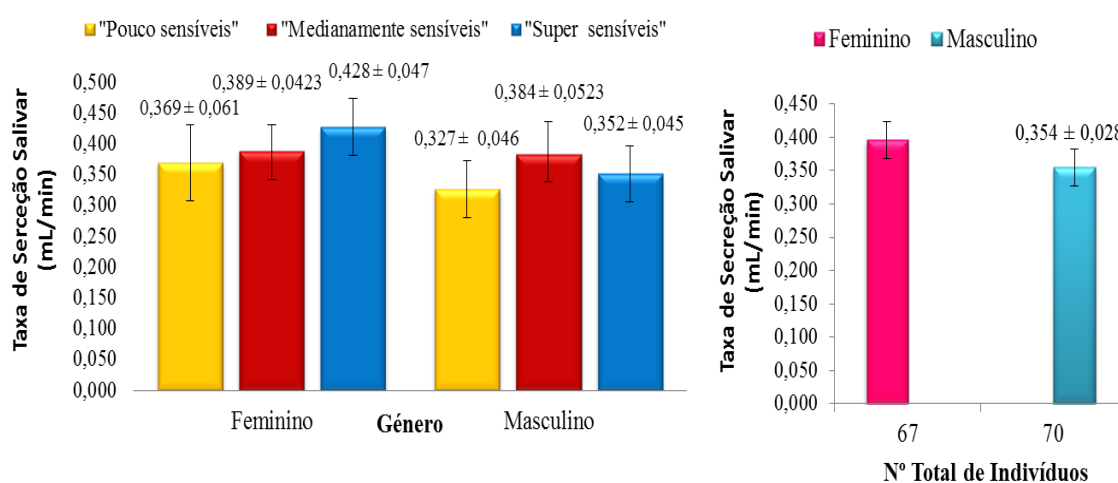


Figura 13. Representação gráfica da taxa de secreção salivar dos indivíduos de acordo com os grupos de sensibilidade gustativa ao PROP e gênero. Os resultados apresentados representam os valores médios \pm erros padrão, ($P < 0,05$).

Quando se analisa a concentração proteica total salivar ($\mu\text{g/mL}$), de acordo com os dados obtidos observa-se uma diferença significativa na concentração proteica total da saliva entre os gêneros, verifica-se que o gênero masculino possui uma concentração de proteína total mais elevada ($555,4 \pm 29,75 \mu\text{g/mL}$) que a concentração de proteína total do gênero feminino ($426,04 \pm 30,4 \mu\text{g/mL}$) para um $P = 0,004$ [figura 14 (A).] (Anexo III).

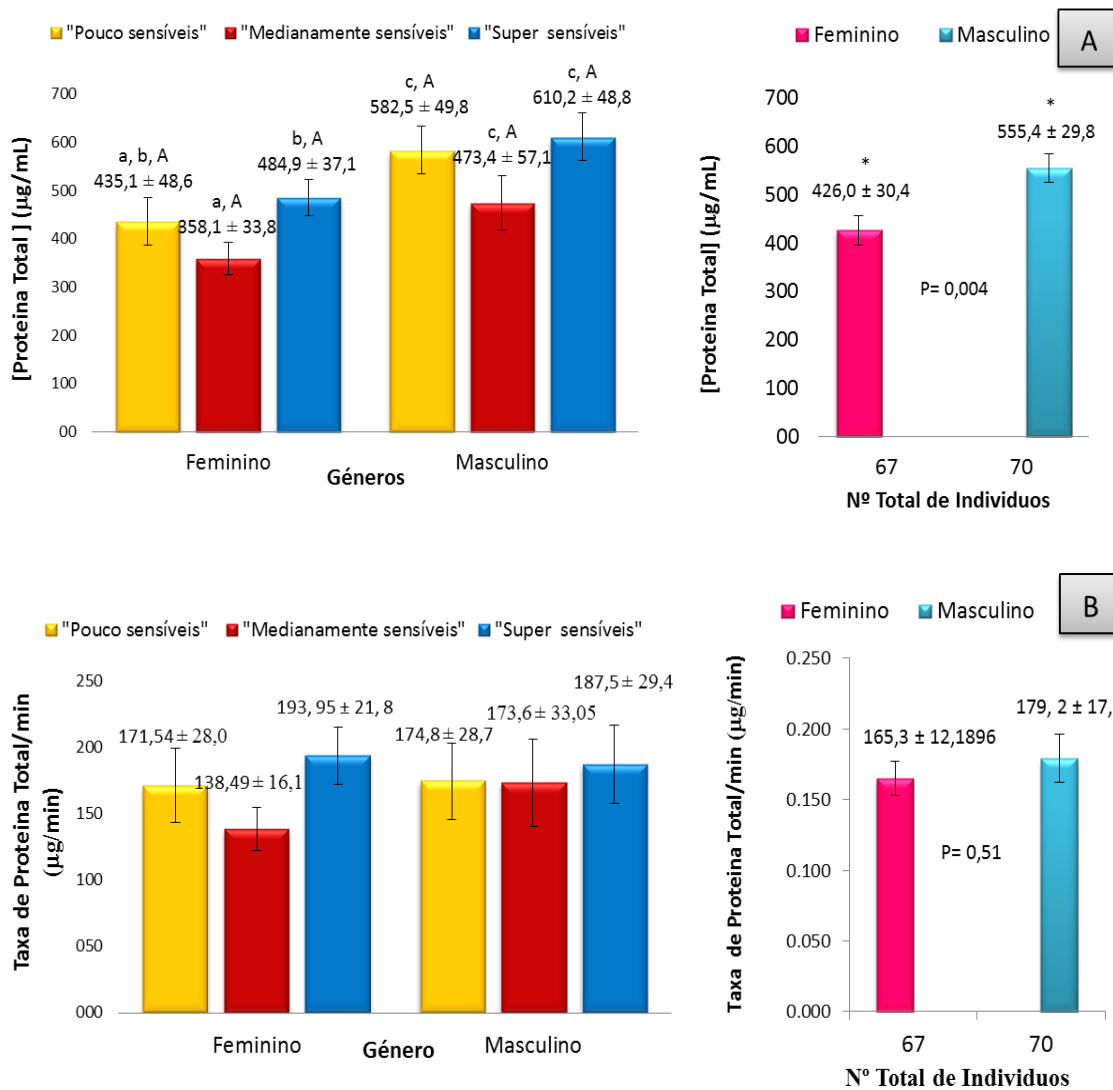


Figura 14. Representação gráfica dos níveis de proteína total na saliva secretada nos indivíduos de acordo com os grupos de sensibilidade gustativa ao PROP e gênero. A concentração de proteína total (µg/ml) [figura 14. (A)] e a taxa de proteína total por minuto de saliva produzida (µg/min) [figura 14. (B)]. Os resultados apresentados representam os valores médios ± erros padrão. As letras minúsculas diferentes indicam a existência de diferenças significativas entre os grupos de sensibilidade, dentro do mesmo gênero. Letras maiúsculas indicam a comparação entre gêneros para cada um dos grupos de sensibilidade (P < 0,05) (Anexo III).

Verificou-se também que existe uma diferença significativa entre grupos de sensibilidade ao PROP no gênero feminino, as mulheres “medianamente sensíveis” ($358,1 \pm 33,8$) têm uma concentração de proteína total inferior às mulheres “super sensíveis” ($484,9 \pm 37,1$), para um $P < 0,005$ [figura 14. (A)] (Anexo III).

Em relação ao gênero masculino não se verificaram diferenças significativas da concentração de proteína total que possuíam na saliva, em relação aos grupos de sensibilidade gustativa. Em termos de concentração total de proteína, na generalidade, independentemente dos gêneros, verifica-se uma tendência para que os indivíduos “medianamente sensíveis” tenham menor concentração de proteína total, que os indivíduos “pouco sensíveis” (figura 14.)

Em relação à taxa de proteína total por minuto de saliva produzida na cavidade oral, não se verificaram diferenças significativas nos diferentes grupos de sensibilidade, nem de acordo com o gênero dos indivíduos. [figura 14. (B)].

4.3. Determinação da atividade enzimática da α -amilase Salivar.

4.3.1. Otimização do método do DNS para a determinação da atividade enzimática da α -amilase salivar.

Para otimizar o método do DNS e aplica-lo na determinação da atividade enzimática da α -amilase efetuou-se o estudo da atividade enzimática da amilase em relação à concentração de proteína total da saliva, já que não se sabe previamente qual a concentração de enzima total na saliva, juntamente com o estudo da atividade enzimática em relação a um determinado período de tempo (figura 15.).

A atividade enzimática é determinada pela medida da quantidade de produto produzido ou de quantidade de substrato utilizado (amido) por unidade de tempo sob elevadas concentrações, ou em condições de saturação de substrato. A atividade enzimática deve ilustrar a proporcionalidade para a quantidade de enzima adicionada. Quanto mais quantidade de enzima é adicionado (saliva que contém a α -amilase), a atividade enzimática deve variar na mesma proporção (a formação de glucose), deverá

ser, duas a três vezes maior. Verificou-se que os ensaios foram lineares para as concentrações de proteínas testadas, de 1 µg/mL a 2 µg/mL [figura 15 (A)].

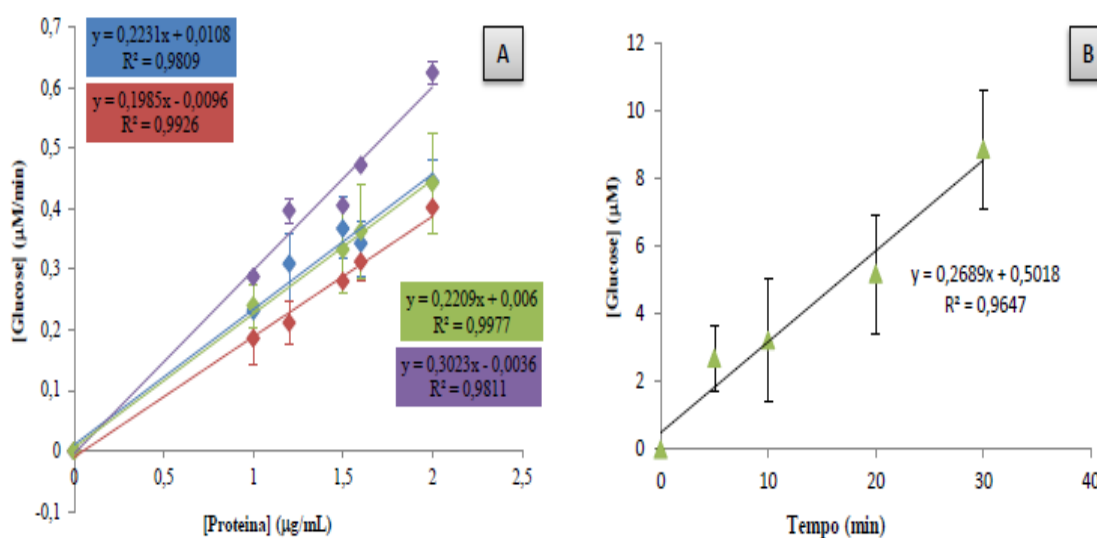
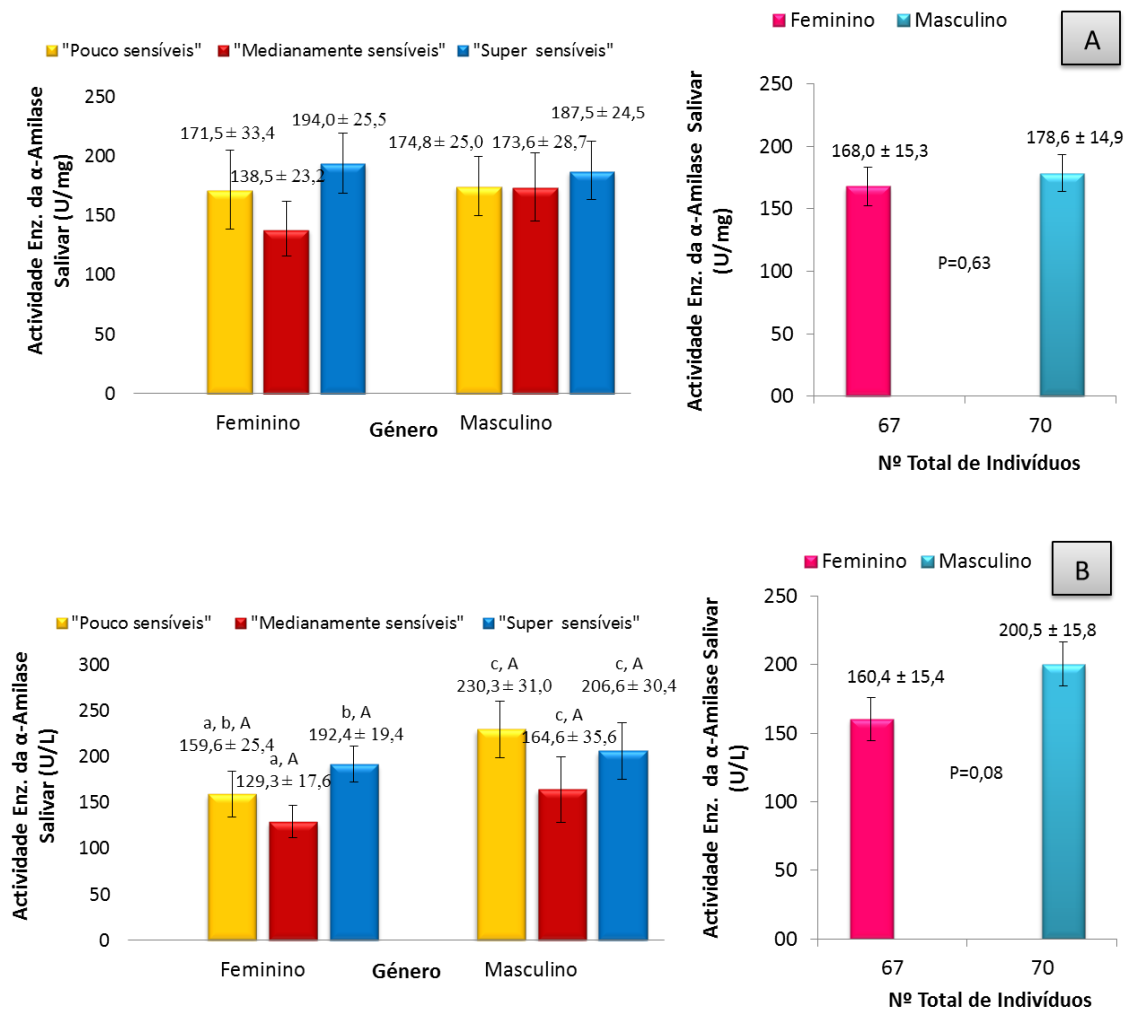


Figura 15. (A) Estudo da linearidade do ensaio enzimático da α -amilase relativamente à concentração de proteína total. Os resultados apresentados representam valores médios \pm desvios padrão de um conjunto de quatro experiências realizadas independentemente, com saliva de quatro indivíduos diferentes. (B) Estudo da linearidade do ensaio enzimático da α -amilase relativamente ao tempo. Para este estudo utilizou-se uma concentração de proteína total de 1µg/µL. Os resultados apresentados representam os valores médios \pm desvios padrão de um conjunto de três experiências realizadas independentemente.

Num ensaio enzimático é crítico o fato da concentração do substrato poder ser saturada durante o período da reação, e a quantidade do produto (glucose) ou substrato medido ser linear acima do período que a reação decorre. Por isso são testados vários tempos para se observar onde a atividade da α -amilase expressa em [glucose] é linear. A atividade enzimática é obtida através do declive da linearidade da relação entre [glucose] versus o tempo [figura 15 (B)].

4.3.2. Determinação da atividade enzimática da α -amilase salivar.

Com a determinação da atividade enzimática da α -amilase salivar nas amostras de saliva em estudo, através do método do DNS, determinadas em (U/mg) [figura 16. (A)], (U/L) [Figura 16. (B)] e (U/min) [Figura 16. (C)], verificou-se que não existe diferenças significativas na atividade enzimática da α -amilase ao nível dos três grupos de sensibilidade gustativa ao composto PROP, no género masculino (figura 16.). No género feminino não se verificou diferenças significativas entre os diferentes grupos de sensibilidade ao PROP para a atividade enzimática da α -amilase salivar (U/mg) (figura 16.).



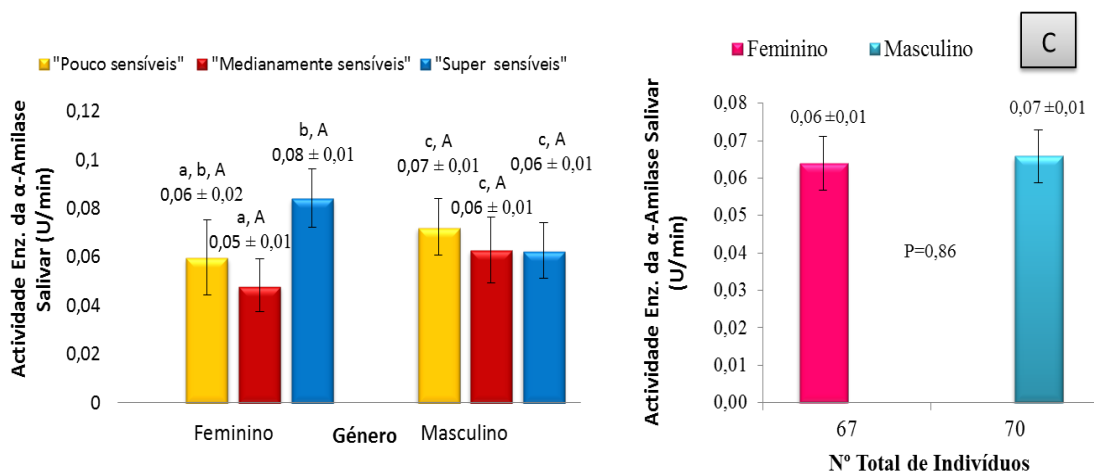


Figura 16. Representação gráfica da atividade enzimática da α -amilase salivar nos indivíduos dos diferentes grupos de sensibilidade ao PROP em (U/mg) [figura 16. (A)], em (U/L) [figura 16. (B)] e em (U/min) [figura 16. (C)], respetivamente. Os resultados apresentados representam os valores médios \pm erros padrão. As letras minúsculas diferentes indicam a existência de diferenças significativas entre os grupos de sensibilidade, dentro do mesmo género. Letras maiúsculas indicam a comparação entre géneros para cada um dos grupos de sensibilidade ($P < 0,05$) (Anexo III).

Nas atividades enzimáticas da α -amilase (U/L) [figura 16. (B)], e (U/min) [figura 16. (C)], verificam-se diferenças significativas para o género feminino, sendo que nestas atividades enzimáticas da α -amilase, as mulheres “super sensíveis” apresentam-se com atividades enzimáticas mais elevadas que as “mulheres medianamente sensíveis” ao PROP [figura 16. (B) e (C)] para um $P < 0,05$ (Anexo III). Relativamente a atividade enzimática da α -amilase salivar (U/L) [figura 16. (B)], verifica-se uma tendência, independentemente dos géneros para os indivíduos “pouco sensíveis” possuírem uma atividade enzimática mais elevada que os indivíduos “medianamente sensíveis” ao PROP, o mesmo acontece para a atividade enzimática da α -amilase salivar (U/min) [figura 16. (C)]. Relativamente a atividade enzimática da α -amilase salivar (U/L), não sendo uma diferença significativa, verifica-se que indivíduos os masculinos “pouco sensíveis” possuem uma atividade enzimática da α -amilase (U/L) mais elevada que os indivíduos “super sensíveis” [figura 16. (B)]. Na generalidade para todas as atividades enzimáticas da α -amilase (U/mg) [figura 16. (A)], (U/L) [figura 16. (B)] e (U/min) [figura 16. (C)], determinadas independentes dos géneros a que os indivíduos pertencem, verifica-se uma tendência de todos indivíduos “pouco –

sensíveis” ao PROP terem maior atividade enzimática da α -amilase em relação aos indivíduos “medianamente – sensíveis”.

4.4. Análise da expressão das enzimas α -amilase salivar e CA VI.

4.4.1 Perfil proteico salivar humano.

Para se verificar diferenças no perfil proteico da saliva dos indivíduos em estudo, efetuou-se a eletroforese SDS-PAGE (Anexo IV). Não se verificaram diferenças na expressão das duas bandas pertencentes a α -amilase salivar e a CA VI, respetivamente, nos diferentes indivíduos pertencentes aos diferentes grupos de sensibilidade, através da eletroforese SDS-PAGE. As massas moleculares aparentes calculadas correspondem as bandas das massas moleculares da α -amilase de 55 kDa e CA VI de 40,5 kDa (figura 17.). A expressão da α -amilase é muito mais intensa praticamente em todos os indivíduos independente do grupo de sensibilidade ao composto PROP. Com a fraca intensidade expressa pelas bandas com as massas moleculares correspondentes a CA VI, coradas com o reagente azul de Comassie, não foi possível fazer uma análise comparativa entre os níveis de expressão da CA VI nos vários indivíduos dos diferentes grupos de sensibilidade ao PROP, nos géis obtidos por eletroforese SDS-PAGE. Para se proceder a análise comparativa, foi necessário recorrer a técnica de western Blottig, que se verificará em seguida. Através dos géis SDS-PAGE observa-se a existência de 6 bandas nos dois géis apresentados (figura 17.), que poderão indicar a existência de outras proteínas na saliva dos diferentes indivíduos.

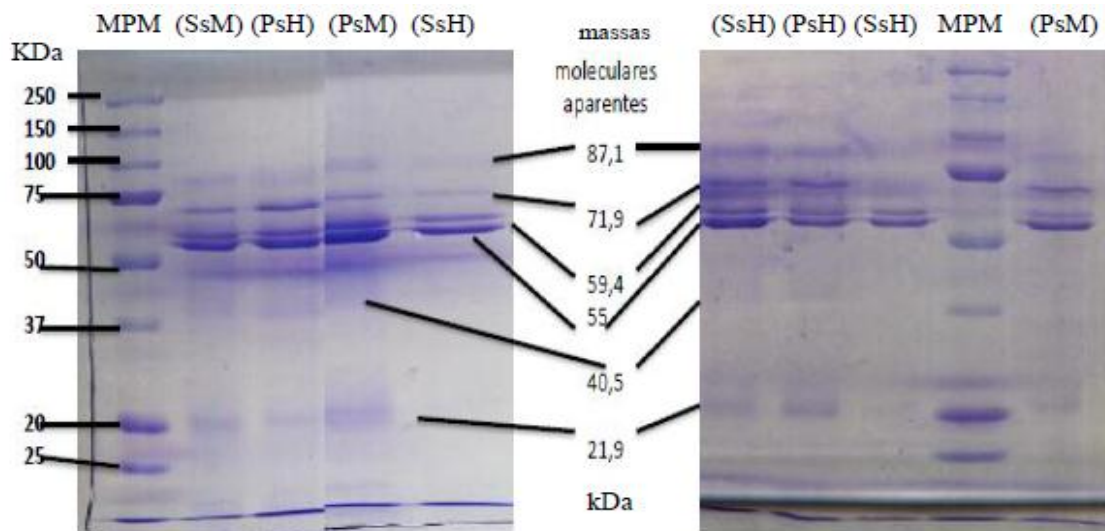


Figura 17. Perfil proteico salivar de indivíduos masculinos e femininos “ Pouco sensíveis” e “Super sensíveis”. MPM = Marcador de massas moleculares; SsM = “Super sensível” Mulher; PsH = “Pouco sensível” Homem; SsH = “ Super sensível” Homem; PsM = “Pouco sensível” Mulher.

4.4.2. Avaliação da expressão da α -amilase salivar e da CA VI

Foi efetuada a imunomarcação através de Western Blotting para identificar a presença e analisar a intensidade da expressão das proteínas em estudo (Anexo V). Foi analisada a expressão de proteínas com massas moleculares aparente de (55 kDa) para a α -amilase e de (40 kDa) para a CA VI na saliva mista humana de indivíduos “Pouco sensíveis”, “Medianamente sensíveis” e “ Super sensíveis” (Anexo V). Para todas as amostras de saliva em que a técnica foi aplicada, praticamente todas as amostras apresentaram um resultando positivo relativamente a presença de α -amilase e da CA VI, verificando-se constantemente uma maior intensidade na expressão de α -amílase salivar em todas as amostras de saliva. Analisando a expressão de CA VI verifica-se que esta é mais variável na saliva de individuo para individuo e não tão intensa como a α -amílase.

Após a análise estatística dos resultados constata-se que não existe praticamente diferenças significativas quando comparadas as bandas da α -amílase salivar de todos os indivíduos de diferentes grupos de sensibilidade ao PROP (figura 18.). Verifica-se uma tendência para as mulheres independentemente do grupo de sensibilidade terem a α -amílase mais expressa que os homens. No caso da CA VI, em alguns casos, verifica-se

que nos vários blots efetuados, os homens “super sensíveis” apresentam esta proteína mais expressa relativamente aos outros indivíduos (Figura 18. e tabela II). Verifica-se uma tendência, da saliva de homens com uma maior sensibilidade, terem esta proteína mais expressa, relativamente aos indivíduos dos outros grupos de sensibilidade ao PROP (tabela II e III). Mas para se definir e confirmar esta tendência de os indivíduos masculinos “super sensíveis” ao PROP terem uma expressão de CA VI mais elevada, procedeu-se a imunomarcação para a CA VI só para indivíduos masculinos (figura 19.).

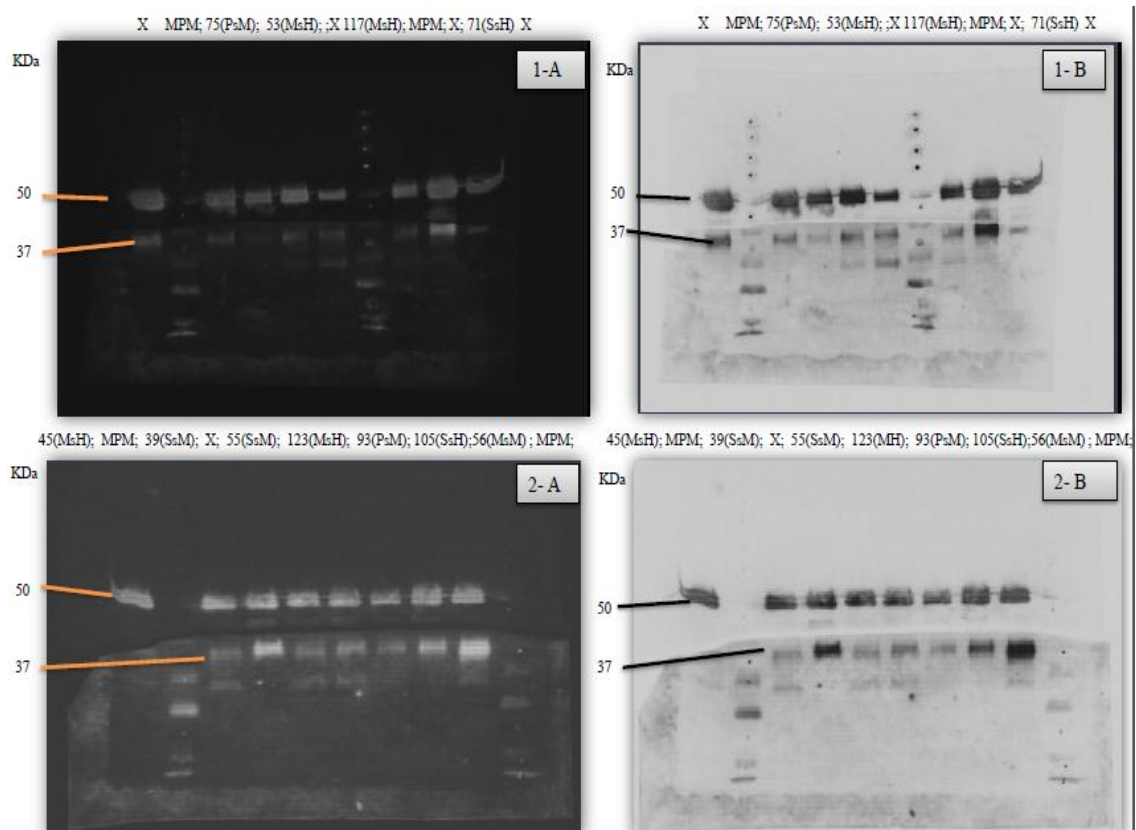


Figura 18. Exemplos representativos de membranas de Western Blotting efetuadas nesse estudo, evidenciando a presença das proteínas, α -amilase e CA VI nas amostras de saliva de indivíduos com diferentes sensibilidades ao PROP. (1 e 2 -A) Imagem da membrana com contraste normal. (1 e 2 -B) Imagem da membrana com contraste invertido. Identificação das amostras de saliva: 75; 53; 117; 71, 45; 39; 55; 123; 93; 105; 56. MPM = Marcador de massas moleculares; SsM = “Super sensível” Mulher; PsH = “Pouco sensível” Homem; MsH = “Medianamente sensíveis” Homem; SsH = “ Super sensível” Homem; MsM = “Medianamente sensíveis” Mulher; PsM = “Pouco sensível” Mulher; X = individuo retirado do estudo. A ordem com que está descrita a legenda nas membranas, é a ordem da aplicação das amostras no respetivo gel de SDS-PAGE, da esquerda para a direita.

Tabela II. Valores de Volumes das bandas de CA VI identificadas na membrana de Western Boltig da figura 18., de acordo com as respectivas amostras de salivas dos diferentes indivíduos, em percentagem (Anexo VI).

Membrana 1		Membrana 2	
Amostras	% Volume ajustado	Amostras	% Volume ajustado
75 (PsM)	8,87	39 (SsM)	9,24
53 (MsH)	20,59	55 (SsM)	9,32
117(MsH)	9,48	123 (MsH)	10,26
71 (SsH)	15,82	93 (PsM)	7,62
		105 (SsH)	14,98
		56 (MsM)	29,86

A percentagem de volume ajustado de cada amostra, relativamente a todas as amostras presente na membrana da figura 18. SsM = “Super sensível” Mulher; PsH = “Pouco sensível” Homem; MsH = ”Medianamente sensíveis” Homem; SsH = “ Super sensível” Homem; MsM = “Medianamente sensíveis” Mulher; PsM = “Pouco sensível” Mulher. Os valores em percentagem a negrito referem-se aos indivíduos masculinos “Super sensíveis” que expressam intensivamente a CA VI.

4.3. Análise da expressão da CA VI em indivíduos masculinos.

De acordo com os dados obtidos (informação recolhida) das membranas de western blotting, verificou-se que há uma tendência para a expressão da CA VI em algumas membranas estar mais expressa, ou só por si só, com volumes elevados para os homens “super sensíveis” em relação aos outros indivíduos. Em casos pontuais (poucos) a CA VI aparece expressa com baixa intensidade em homens “super sensíveis”. Para tentar confirmar este facto, fez-se um gel SDS-PAGE, onde foram só aplicadas amostras de saliva de indivíduos masculinos dos diferentes grupos de sensibilidade, para se verificar, alguma diferença no perfil proteico (figura 19.)

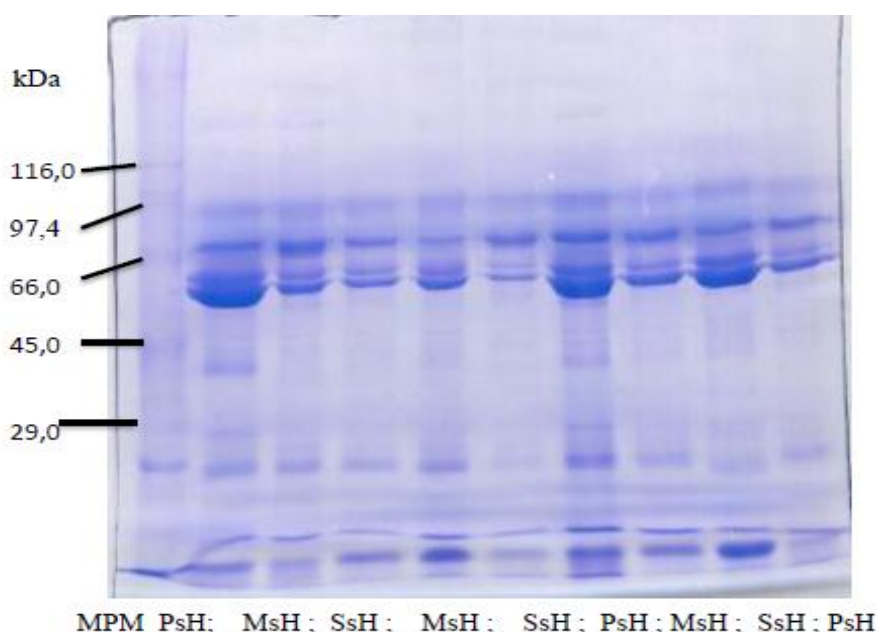


Figura 19. Um gel SDS-PAGE representativo, só com amostras de indivíduos homens dos diferentes grupos de sensibilidade ao PROP. PsH = “Pouco sensível” Homem; MsH = ”Medianamente sensíveis” Homem; SsH = “ Super sensível” Homem; MPM = Marcador de massas moleculares.

Não verificada nenhuma diferença no perfil proteico da saliva dos indivíduos masculinos, decidiu-se tentar verificar e confirmar, a tendência da CA VI estar expressa em níveis mais elevados nos homens “super sensíveis”. Recorreu-se mais uma vez a técnica do Western blotting, para a imunomarcação da proteína CA VI (figura 20). Para uma análise mais precisa e confiante das intensidades/volumes da expressão da CA VI, procedeu-se a coloração da outra metade da membrana com o azul de Comassie

(figura 20), onde não estaria a banda de massas moleculares correspondente da CA VI. Este procedimento serviu para aferir com melhor certeza e confiança a verdadeira quantidade de proteína corrida em cada leine do gel de SDS-PAGE que passou para a membrana.

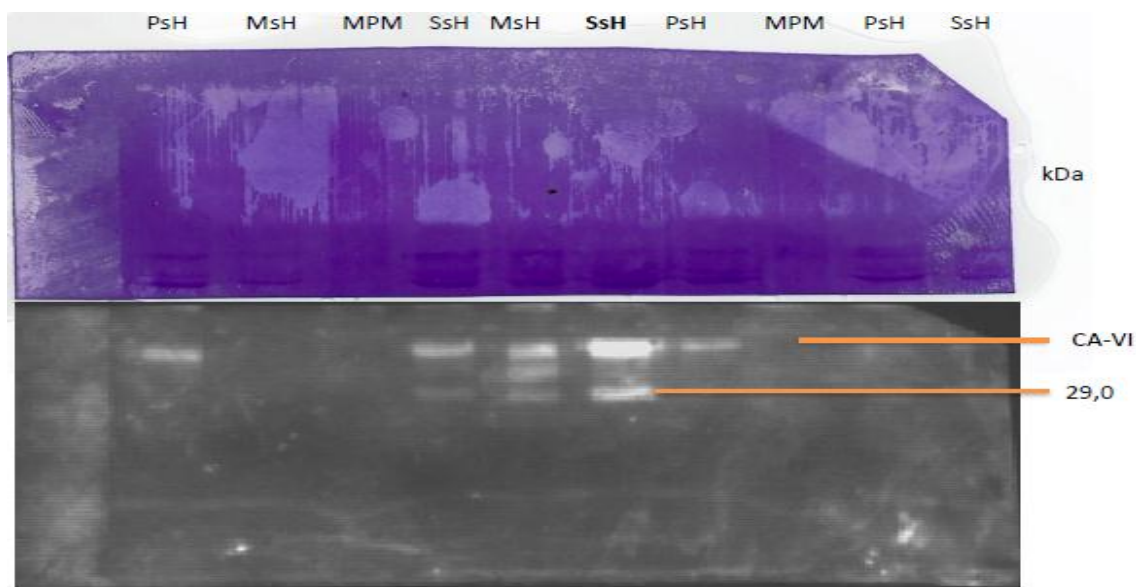


Figura 20. Exemplo representativo de uma membrana corada com o corante Comassie, onde é possível visualizar bandas por imunomarcação as bandas de CA VI com diferentes intensidades de expressão em indivíduos masculinos. PsH = “Pouco sensível” Homem; MsH = “Medianamente sensíveis” Homem; SsH = “ Super sensível” Homem ao PROP. MPM = Marcador de massas moleculares.

Através da membrana corada com o corante azul de Comassie, com alguma dificuldade   possível visualizar em todas as leines a existência de pelo menos três bandas. Nota-se bem as duas isoformas da amilase salivar em todas as leines, numa mais intensas que noutras. Verifica-se na membrana não-corada a visualização de cinco bandas na imunomarcação da CA VI na zona do peso molecular das proteínas, correspondente a massa aparente calculada anteriormente de 40,5 kDa. Na parte da membrana não-corada da figura 20., nota-se com mais intensidade uma banda, correspondendo a banda da CA VI pertencente a um indivíduo do g nero masculino “super- sensível”.   possível verificar na membrana, uma imunomarcação inespecífica, ou outra isoforma da anidrase carb nica numa zona de massa molecular dos 29 kDa de acordo com o marcado de massas moleculares utilizado.

Esta análise comparativa pode ser melhor interpretada e visualizada na tabela 3, que sugere todos os volumes de ajuste (%) (Anexo VI), para todas as membranas feitas ao longo do estudo, para a imunomarcção da CA VI. Através desta análise verificou-se que os indivíduos do género masculino “super sensíveis” tendem a expressar com maior intensidade a proteína CA VI.

Tabela III. Valores de volumes (%) da expressão de CA VI nas várias amostras de salivas pertencentes a indivíduos dos diferentes grupos de sensibilidade ao PROP.

Membrana 1		Membrana 2		Membrana 3		Membrana 4		Membrana 5		Membrana 6		Membrana 7	
Amostras	Vol. ajust. (%)	Amostras	Vol. ajust. (%)	Amostras	Vol. ajust. (%)	Amostras	Vol. ajust. (%)	Amostras	Vol. ajust. (%)	Amostras	Vol. ajust. (%)	Amostras	Vol. ajust. (%)
75 (PsM)	8,87	39 (SsM)	9,24	109 (SsH)	23,75	28 (SsH)	25,83	118 (PsM)	19,30	42 (MsM)	11,53	1 (SsH)	38,26
53 (MsH)	20,59	55 (SsM)	9,32	75 (PsM)	45,71	51 (MsM)	30,07	105 (SsH)	25,18	37 (SsH)	23,48	108 (MsM)	28,72
117 (MsH)	9,48	123 (MsH)	10,26	63 (PsH)	8,30	12 (SsH)	11,40	9 (PsH)	24,09	81 (PsM)	9,75	97 (PsM)	0,59
71 (SsH)	15,82	93 (PsM)	7,62	11 (SsM)	6,03	21 (PsH)	3,53	67 (SsM)	13,11	73 (SsM)	16,70	125 (MsM)	7,45
		105 (SsH)	14,98			65 (MsH)	4,66			120 (MsM)	10,47	14 (PsH)	0,43
		56 (MsM)	29,86			29 (PsM)	8,17			52 (PsH)	14,93	69 (MsM)	21,79
										16 (SsM)	6,07	122 (PsH)	3,69
										130 (PsH)	7,06		

Valores de volumes ajustados (%) de CA VI para todas as amostras de saliva, em que foi realizada a imunomarcção em western blotting. As amostras estão identificadas por códigos numéricos. SsM “Super sensível” Mulher; PsH = “Pouco sensível” Homem; MsH = “Medianamente sensíveis” Homem; SsH = “Super sensível” Homem; MsM = “Medianamente sensíveis” Mulher; PsM = “Pouco sensível” Mulher. Os valores de volume a negrito representam os valores de volume para CA VI nos homens “super sensíveis” ao PROP.

5. Discussão

Existem vários estudos que sugerem que a percepção gustativa humana é afetada por diversos fatores que estão na base da variabilidade inter – individual, para a sensibilidade gustativa: fatores genéticos, como o polimorfismo de genes de recetores do gosto amargo, fatores ambientais e fisiológicos, como a dieta, o estado hormonal, tamanho e densidade das papilas gustativas, a idade e o género, composição salivar e taxa de secreção salivar (Bajec & Pickering, 2008)

Apesar do enfoque de muitos investigadores nesta área científica ter sido a sensibilidade para o gosto amargo dos compostos PTC e PROP (Prescott, et al., 2001), alguns estudos apontam no sentido de um envolvimento da composição proteica da saliva nessa sensibilidade (ex. Padiglia et al., 2010)

O presente trabalho teve como principal objetivo estudar a relação entre a composição proteica da saliva e a sensibilidade para o gosto amargo do composto PROP, numa população de indivíduos, de ambos os sexos, com idades compreendidas entre os 18 e os 30 anos.

De entre a totalidade de indivíduos estudada neste trabalho, a população distribuiu-se cerca de um terço em cada grupo; 28,5% foram classificados como “Pouco sensíveis”, 35,04% como “medianamente sensíveis” e 36,5% como “super sensíveis” ao gosto amargo do PROP, valores semelhantes aos obtidos num estudo de sensibilidade gustativa ao PROP realizados na Itália, também na comunidade universitária local (jovens) (Padiglia, et al., 2010). Outros estudos realizados nos Estados Unidos da América mostraram (Zhao, et al.; 2003) uma percentagem mais elevada de indivíduos “medianamente sensíveis” (42%) e um menor número de indivíduos “super sensíveis” (31%) ao PROP. Neste referido estudo foram analisados não só indivíduos caucasianos, apesar de ser, a maior parcela de indivíduos, em relação a população total estudada. Fatores como a idade, raça e cultura poderão contribuir para estas diferenças entre os vários estudos.

Estudos efetuados por Tepper, et al. (2001), levantaram questões acerca da validade da utilização do NaCl como padrão em estudos de avaliação da sensibilidade gustativa para o composto PROP, visto ter sido observado que o gosto salgado do NaCl, aumenta proporcionalmente em função do aumento do gosto amargo proporcionado

pela prova do PROP. Tentou-se minimizar este efeito no presente estudo, através da lavagem bucal com água mineral, entre cada prova, de cada solução dada a provar aos voluntários e apresentando as soluções por uma ordem aleatória aos diferentes indivíduos.

A taxa de secreção salivar foi o primeiro parâmetro a ser analisado. Não se observaram diferenças significativas entre homens e mulheres, nem entre indivíduos pertencentes aos três grupos de sensibilidade ao PROP (figura 13.). Note-se que a saliva foi recolhida aos indivíduos em estudo, durante cinco minutos sem estimulação. Estão descritas diferenças na taxa de secreção salivar entre homens e mulheres idosos, sendo a inferior nas mulheres (Eleni, et al (2012)). Este parâmetro é também fortemente influenciado pela idade e em jovens as taxas de secreção salivar podem variar, em ambos os sexos, entre 0,47 e 0,6 mL/min (Eleni, et al (2012)), valores nos quais se enquadram os obtidos no presente trabalho (0,4 mL/min). Foi sugerido que variações na taxa de secreção salivar poderiam explicar diferenças na sensibilidade gustativa: a simples diluição pela saliva muda o pH (pela capacidade tampão de compostos ácidos) o que pode afetar a percepção do ácido, por exemplo (Guinard, et al., 1998; Neyraud et al., 2003). De acordo com os estudos realizados por Eleni, et al. (2012), o fluxo salivar está diretamente associado com o método de recolha de saliva. Para minimizar diferenças, todas as amostras de saliva foram recolhidas sem estimulação. Para além disso, e com o intuito de minimizar a influência de fatores externos, como o tipo de alimento/bebida ingerido (Engelen, et al., 2007), só foram considerados para o estudo os indivíduos que consumiram alimento e/ou bebidas até 1 hora antes da recolha de saliva. No entanto, não é de excluir que pequenas alterações nas condições de recolha possam ter existido, uma vez que os testes de sensibilidade e as recolhas de saliva não foram realizados todos no mesmo dia. Essas pequenas variações, a terem existido, poderão contribuir para o aumento da variabilidade entre indivíduos. Para aferir com maior exatidão este parâmetro seria útil ter várias recolhas do mesmo indivíduo em dias diferentes.

Em relação à concentração de proteína total salivar, que foi um outro parâmetro analisado neste estudo, observou-se que os indivíduos do género masculino possuem uma concentração de proteína total mais elevada que indivíduos do género feminino (figura 14.). A existência de significância estatística para as diferenças entre as mulheres e a ausência para os homens poderá ter a ver com uma maior variabilidade inter -

individual relativamente a este parâmetro entre os indivíduos masculinos. Estudos realizados por Engelen, et al. (2007) demonstraram que a concentração de proteína total era elevada quando a salivação não era estimulada, e diminuta quando se aumentava o grau de estimulação, indicando que com um aumento da taxa de secreção salivar, ocorre um efeito de diluição da proteína total na saliva. Assim, tendo em conta que mais importante do que a concentração proteica da saliva, poderá ser o total de proteína que chega à cavidade oral, por unidade de tempo, esse parâmetro foi também analisado. Aqui já não se observaram diferenças significativas na quantidade de proteína por minuto de saliva existente na cavidade oral, entre os géneros, nem entre os diferentes grupos de sensibilidade gustativa. No entanto, há que realçar novamente que para haver maior certeza em relação à taxa de secreção individual teria sido bom ter mais recolhas de cada indivíduo, em dias diferentes. Elevadas concentrações de proteína total foram correlacionadas com baixas classificações de sensibilidade gustativa em relação a perceção de produtos semi-sólidos (Engelen et al., 2007). Nesses estudos foi sugerido que a elevada concentração proteica total possa conduzir a uma diminuição da viscosidade do produto provado, e conduzir a uma baixa sensação de espessura dos produtos. Para sensações orais, como a adstringência, também têm sido referidos efeitos da concentração proteica a nível da intensidade percebida (Pickering et al., 2004). Estes estudos, em conjunto com o presente, apontam para a importância da concentração proteica da saliva na perceção dos alimentos.

De acordo com estudos descritos por Cabras, et al. (2012) demonstraram que a predisposição genética para o gosto amargo do PROP é refletida na proteómica salivar, referindo a associação entre a sensibilidade para o PROP e níveis de péptidos salivares específicos, como por exemplo os pertencentes a família das proteínas ricas em prolina (PRPs). Também Padiglia et al. (2010) referiu uma associação entre polimorfismos a nível dos genes que codificam para a proteína CA VI e a sensibilidade gustativa.

A α -amílase salivar é uma das proteínas presentes em maior quantidade na saliva. Tendo em conta a sua ação a nível da hidrólise do amido, os níveis em que se encontra poderão influenciar a sensibilidade gustativa, pelo menos a sensibilidade gustativa para o doce (Engelen, et al. 2007). Tendo em conta que a sensibilidade para o PROP tem sido referida por diversos autores como estando correlacionada com a sensibilidade gustativa em geral (Tepper et al., 2009), não seria de excluir que esta enzima pudesse ser expressa de forma diferente entre os diferentes indivíduos.

De acordo com os resultados obtidos neste estudo, para o género masculino não se verificaram diferenças significativas para indivíduos pertencentes aos diferentes grupos de sensibilidade ao PROP, na atividade enzimática da α -amilase (figura 16). Relativamente ao género feminino, para a atividade enzimática da α -amilase determinada em (U/mg), não se observaram diferenças significativas, para os diferentes grupos de sensibilidades. Observaram-se sim diferenças significativas para a atividade da amílase determinada em (U/L) e (U/min). As mulheres “super sensíveis” possuem uma atividade enzimática (U/L) e (U/min), mais elevada que as mulheres “medianamente sensíveis” [Figura 16. (B) e (C)]. Estudos descritos por Beltzer, et al. (2010) demonstraram que a atividade enzimática da α -amilase é influenciada pela taxa de secreção salivar, tendo sido rigorosamente relacionada nestes estudos com o local da recolha da saliva (locais na cavidade oral), a duração e a técnica de recolha utilizada. De acordo com estes estudos, existe uma elevada atividade enzimática da α -amilase em fluidos orais recolhidos em áreas da boca perto das glândulas parótidas e submandibulares. Desta forma, alguma variabilidade inter - individual na atividade enzimática da amílase não deverá ser causada por diferenças na proveniência da saliva. Estudos realizados por Rohleder, et al. (2006), investigaram a influência da taxa de secreção salivar na atividade enzimática da α -amilase em indivíduos submetidos a stresse, concluindo que o stresse induzido aos indivíduos, aumentara atividade enzimática da α -amilase, independentemente da taxa de secreção salivar. Apesar de se ter tentado minimizar as condições de stresse, os níveis de stresse poderão não ser os mesmos para todos os indivíduos, contribuindo para alguma variabilidade.

Tal como no caso da quantidade de proteína total, também o mais importante, em termos biológicos, poderá ser a atividade enzimática desta proteína, na cavidade oral, por unidade de tempo. O facto das mulheres supersensíveis apresentarem maior atividade de amílase por minuto reforça a ideia de um envolvimento desta proteína a nível da sensibilidade gustativa. No entanto, não foi encontrada informação, na bibliografia, acerca dos níveis de α -amilase em indivíduos supersensíveis para o PROP, pelo que este é um ponto que merece ser investigado com mais detalhe em estudos futuros.

Os estudos de Beltzer, et al. (2010) mostraram diferenças na atividade enzimática da α -amilase entre homens e mulheres, sendo a atividade enzimática mais elevada em homens em relação as mulheres. No presente trabalho essas diferenças não

se observaram, ainda que em termos médios os valores das atividades de α -amílase para os homens tenham sido mais elevados que para as mulheres (Figura 16.). Já pela observação da expressão das bandas separadas por SDS PAGE (figura 17.) observou-se uma tendência para que as mulheres expressassem as bandas com massas moleculares aparentes correspondentes à amílase em níveis mais elevados do que os homens ($P=0,08$), tal como será discutido adiante. Esta diferença entre os resultados obtidos para a atividade enzimática da amílase e a expressão das bandas nos géis poderá dever-se à existência de outras proteínas com as mesmas massas moleculares, ou ao facto de nem toda a amílase observada nos géis poder estar ativa na saliva.

Estudos relatados por Quintana, et al. (2009), que a atividade enzimática da α -amilase influencia a perceção gustativa, um deles relacionando-a com o gosto salgado, outro mostrando a existência de variações na atividade enzimática da α -amilase na saliva após estimulação com sacarose. Outros estudos relataram possíveis ligações entre a composição proteica da saliva e a sensibilidade gustativa para o gosto amargo da cafeína, e observaram que a saliva de indivíduos “super sensíveis” a este composto continha níveis elevados das diferentes isoformas da α -amilase (Dsamou, et al. (2011)).

De acordo com estudos relatados por Quintana, et al. (2009), a CA VI está presente em níveis elevados na saliva de mulheres jovens comparado com os níveis na saliva dos homens jovens. No presente trabalho observou-se alguma variabilidade na expressão de CA VI entre os diferentes indivíduos do género feminino, independentemente do grupo de sensibilidade gustativa. Em relação à proteína CA VI, no caso das mulheres, não se observaram diferenças na expressão que se pudessem correlacionar com a sensibilidade gustativa (figura 18.). No entanto, quando se observam apenas para as amostras de saliva dos homens, há uma tendência para serem os indivíduos “super sensíveis” aqueles que apresentam maiores níveis desta proteína (tabela 2). Ainda que se tenha observado esta tendência, há que ter em atenção que nem todos os homens “super sensíveis” têm expressões de CA VI aumentadas, pelo que esta proteína não deverá servir, só por si, como biomarcador de sensibilidade gustativa.

Vários estudos tinham já referido uma associação da proteína CA VI e a perceção do gosto amargo. Está descrita uma associação entre polimorfismos de genes que codificam para a proteína CA-VI e os fenótipos “pouco sensível”, “medianamente sensível” e “super sensível” ao composto PROP (Padiglia, et al., (2010)). Estes

resultados sugeriram que o polimorfismo rs2274333 influencia a ligação do zinco à CA VI, da qual é dependente a sua atividade e a qual se tem mostrado crucial na função gustativa humana. Outros autores como Cabras, et al.,2012, também demonstraram recentemente que a capacidade de resposta à sensibilidade ao PROP está fortemente associada à funcionalidade da CA VI, e que a combinação entre os genes do recetor do gosto amargo TAS2R38 (recetor que liga o composto PROP) e os genes da CA VI explicam parcialmente a percepção gustativa dos “super sensíveis” para compostos amargos.

Se a nível de genes para a CA VI há informação, consoante o grupo de sensibilidade, já para os níveis segregados desta proteína parece não haver tanta informação na bibliografia.

O fato de termos observado a CA VI com uma tendência para estar mais expressa nos homens “super sensíveis” vai de encontro aos estudos que apontam para a importância da presença desta proteína na percepção do gosto amargo, uma vez que autores como Henkin et al. (1999), observaram uma expressão reduzida de CA VI em indivíduos com distúrbios a nível do gosto. A grande variabilidade observada para as mulheres, que não permite encontrar as mesmas diferenças que as observadas nos homens, pode dever-se a fatores externos como os níveis hormonais (ciclo – menstrual). Sabe-se que o sistema hormonal feminino é mais irregular do que o masculino, e que a composição da saliva pode variar com fatores hormonais. Alguns estudos têm sugerido alterações na composição proteica da saliva de mulheres. Por exemplo, a elevada prevalência de caries em mulheres tem sido sugerida em parte, devido a diferenças na composição salivar e no fluxo salivar induzido por flutuações hormonais (Quintana, et al.,2009).

6. Conclusão

O presente trabalho reforça a importância da saliva para a percepção dos alimentos, e a importância da realização de estudos futuros que permitam esclarecer o papel das proteínas estudadas e compreender o potencial envolvimento de outras proteínas salivares.

A percepção gustativa do alimento envolve vários aspectos, tais como a intensidade, a qualidade e o valor hedônico da sensação perceptiva. A saliva é o principal fluido constituinte do ambiente exterior das células recetoras do gosto, e como tal, desempenha um papel fundamental na sensibilidade gustativa. A percepção do gosto amargo varia muito entre os indivíduos, o que levanta questões subjacentes a essa variabilidade.

O objetivo geral inerente a este trabalho é comparar o perfil proteico salivar entre os grupos de indivíduos com diferenças na sensibilidade para o sabor amargo do composto PROP.

Este objetivo foi dividido em dois objetivos específicos: O primeiro foi direcionado para a atividade enzimática e expressão da α -amilase salivar, que sendo uma das enzimas mais importantes e presente em maior quantidade na cavidade oral até ao momento, os seus níveis não foram correlacionados com a variabilidade inter-individual na sensibilidade gustativa; o segundo objetivo deste trabalho foi comparar a expressão da anidrase carbónica VI (CA VI), entre os indivíduos pertencentes aos diferentes grupos de sensibilidade, pois de acordo com a literatura esta enzima pode estar associada ao gosto amargo.

Neste estudo observou-se que tanto a proteína α -amilase, como a proteína CA VI são diferencialmente expressas entre os grupos de indivíduos analisados.

Em concreto observou-se que:

- i) A população geral estudada se repartiu entre as três classes de sensibilidade ao gosto amargo. No entanto, as mulheres apresentaram maior sensibilidade que os homens, encontrando-se o grupo de menor sensibilidade apenas 20% das mulheres distribuindo-se as restantes de forma equitativa entre os grupos de média e elevada sensibilidade.
- ii) Não se observaram diferenças entre grupos na expressão da α -amilase independentemente de se tratar do género feminino ou masculino; No entanto, a atividade α -amilase tende a ser menor no grupo de indivíduos medianamente sensíveis quer em homens quer em mulheres;
- iii) A expressão da CA VI está aumentada em homens do grupo com supersensibilidade, não se tendo registado diferenças entre os grupos femininos; é ainda de realçar que não se observaram diferenças entre os géneros;
- iv) O grupo com sensibilidade elevada apresentou atividade aumentada da α -amilase e, no género masculino, simultaneamente uma expressão aumentada da CA-VI, relativamente ao grupo com sensibilidade mediana sugerindo que estas enzimas contribuam para uma maior sensibilidade na perceção gustativa, parecendo a primeira ser mais importante no caso das mulheres, enquanto nos homens parecem ambas contribuir para a sensibilidade ao PROP.

Assim, este estudo permitiu tirar duas conclusões principais; em primeiro lugar, que a composição proteica da saliva está relacionada com a sensibilidade gustativa e, em segundo lugar, que a influência deste fluido na perceção gustativa poderá ser diferente entre homens e mulheres.

A realização do presente trabalho contribuiu para clarificar a importância da saliva a nível da sensibilidade gustativa e abre caminho a novos estudos que possam levar a uma melhor compreensão do envolvimento destas e de outras proteínas salivares na perceção gustativa.

7. Referências Bibliográficas

- Aps, J. K., & Martens, L. C. Review: The physiology of saliva and transfer of drugs into saliva. *Forensic Science Internacional*, 2005;**150**: pp. 119-131.
- Bajec, M. R., & Pickering, G. J. Thermal taste, PROP responsiveness, and perception of oral sensations. *Physiology & Behavior*, 2008; **95**: pp. 581-590.
- Bartoshuk, L. Comparing sensory experiences across individuals: recent psychophysical advances illuminate genetic variation in taste perception. *Chemistry Senses*, 2000;**25**: pp. 447-460.
- Bartoshuk, L., Duffy, V., & Miller, I. "PTC/PROP tasting: anatomy, psychophysics, and sex effects". *Physiology & Behavior*, 1994; **56**: pp. 1165-71.
- Behrens, M., & Meyerhof, W. Gustatory and extragustatory functions of mammalian taste receptors. *Physiology & Behavior*, 2011;**105**: pp. 4-13.
- Beltzer, E. K., Fortunato, C. K., Guaderrama, M. M., Peckins, M. K., Garramone, B. M., & Granger, D. A. (s.d.). Salivary flow and alpha-amylase: collection technique, duration, and oral fluid type. *Physiology & Behavior*, 2010 **101**, pp. 289-296.
- Bufe, B., Breslin, P., Kuhn, C., Reed, D., Tharp, C., Slack, J., et al. The molecular basis of individual differences in phenylthiocarbamide and propylthiouracil bitterness perception. *Current Biology*, 2005;**25**: pp. 322-327.
- Cabras, , T., Melis, M., Castagnola, M., Padiglia, A., Tepper, J. B., Messina, I., et al.. Responsiveness to 6-n-Propylthiouracil (PROP) is associated with salivary levels of two specific Basic Proline-Rich Proteins in Humans. *PLoS ONE*, 2012; **7**, pp. 1-9.
- Castagnola, M., Picciotti, P. M., Messina, I., Fanali, C., Fiorita, A., Cabras, T., et al. Potential applications of human saliva as diagnostic fluid. 2011; **31**: pp. 347-357.

- Chen, J. Food oral processing - A review. *Food Hydrocolloids*, 2009;**23**: pp. 1-25.
- Da Costa, G., Lamy, E., Capela e Silva, F., Sales Baptista, E., & Coelho, A. Salivary amylase induction by tannin-enriched diets as a possible countermeasure against tannins. *Journal Chemistry Ecology*, 2008; **34**., pp. 376-387.
- Dodds, M. W., Johnson, D. A., & Yeh, C.-K. Health benefits of saliva: a review. *Journal of Dentistry*, 2005; **33**: pp. 223-233.
- Dsamou, M., Palicki, O., Septier, C., Chabanet, C., Lucchi, G., Ducoroy, P., et al. (2011). Salivary Protein Profiles and Sensivity to the Bitter Taste of Caffeine. *Chemestry Senses*, pp. 1-9.
- Engelen, L., Van den Keybus, P. A., de Wijk, R. A., Veerman, E. C., Nieuw Amerongen, A. V., Bosman, F., et al. The effect of saliva composition on texture perception of semi-solids. *Archives of oral Biology*, 2007;**52**:pp. 518-525.
- Green, B. G., Shaffer, G. S., & Gilmore, M. M. Derivation and evaluation of a semantic scale of oral sensation magnitude with apparent ratio properties. *Chemical Senses*, 1993; **26**: pp. 151 - 158.
- Guinard, J.X., Zoumas-Morse, C. and Walchak, C. Relation between parotid saliva flow and composition and the perception of gustatory and trigeminal stimuli in foods. *Physiol. Behav.*, 1998; **63**, 109
- Henderson, S. A., Drewnowski, A., & Cockroft, J. E. Genetic Sensivity to 6-n-Propylthiouracil Has No Influence on Dietary Patterns, Body Mass Indexes, or Plasma Lipid Profiles of Women. *Journal of thel American Dietetic Association*, 2007;**107**: pp. 1340-1348.
- Huang, C.-M. Comparative proteomic analysis of human whole saliva. *Archives of Oral Biology*, 2004; **49**: pp. 951-962.
- Humphrey, S. P., RDH, MEd, Williamson, R. T., & DMD. A review of saliva: Normal composition, flow, and fuction. *The Journal of Prosthetic Dentistry*, 2001; **85**: pp. 162-9.
- Kawai, T., & Fushiki, T. Importance of lipolysis in oral cavity for oronsensory detection of fat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2003; **285**: pp. R447-R454.

- Kimoto, M., Kishino, M., Yura, Y., & Ogawa, Y. A role of salivary carbonic anhydrase VI in dental plaque. 2006; **51**: pp. 117-122.
- Lamy, E., & Mau, M. Saliva proteomics as an emerging, non-invasive tool to study livestock physiology, nutrition and diseases. *Journal of Proteomics*, 2012 pp. 1-8.
- Miller, G. L. (1959) Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, 1959; **31**:pp. 426-428.
- Naim, M., Nir, S., Spielman, A., Nobel, A., Peri, I., Rodin, S., et al. Hypothesis of receptor-dependent and receptor-independent mechanisms of bitter and sweet transduction: implications for slow taste onset and lingering aftertaste. *Chemistry of taste*, 2002 pp. 2-17.
- Neyraud, E., Prinz, J. and Dransfield, E. NaCl and sugar release salivation and taste during mastication of salted chewing gum. *Physiol & Behav.*, 2003; **79**, 731–737.
- Neyraud, E., Heinzerling, C. I., Bult, J. F., Mesmin, C., & Dransfield, E. Effects of Different Tastants on Parotid Saliva Flow and Composition. *Chemistry Perception*, 2009; **2**:pp. 108-116.
- Neyraud, E., Sayd, T., & Dransfield, E. Proteomic analysis of human whole and parotid salivas following stimulation by different tastes. *J Proteome Res*, 2006;**5**:pp. 2474-2480.
- Nishimori, I., Onishi, S., Vullo, D., Innocenti, A., Scozzafava, A., & Supuran, C. T. Carbonic Anhydrase activators: The first activation study of the human secretory isoform VI with amino acids and amines. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2007;**15**, pp. 5351-5357.
- Out, D., Bakermans-Kranenburg, M. J., Granger, D. A., Cobbaert, C. M., & van IJzendoorn, M. H. State and trait variance in salivary alfa-amilase: A behavior genetic study. 2011 **88**: pp. 147-157.

- Padiglia, A., Zonza, A., Atzori, E., Chillotti, C., Caló, C., Tepper, B. J., et al. Sensitivity to 6-n-propylthiouracil is associated with gustin (carbonic anhydrase VI) gene polymorphism, salivary zinc, and body mass index in humans. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2010; **92**: pp. 539-45.
- Prescott, J., Ripandelli, N., & Ian, W. Binary Taste Mixture Interactions in PROP Non-tasters, Medium-tasters and Super-tasters. *Chem. Senses*, 2001; **26**, pp. 993-1003.
- Quintana, M., Palicki, O., Lucchi, G., Ducoroy, P., Chambon, C., Salles, C., et al. Short-Term Modification of Human Salivary Proteome Induced by Bitter Tastants, Urea and Quinine. *Chemistry Perception* .
- Quintana , M., Olivier, P., Lucchi, G., Ducoroy, P., Chambon, C., Salles, C., et al. (2009). Inter - individual variability of protein patterns in saliva of healthy adults. *72*, pp. 822 – 830.
- Rosa, N., Correia, M. J., Arrais, J. P., Lopes, P., Melo, J., Oliveira, J. L., et al. From the salivary proteome to the OralOme: Comprehensive molecular oral biology. *Archives of oral biology*, pp.2012 1-12.
- Reed, D. R., Tanaka, T., & McDaniel, A. H. Diverse tastes: Genetics of sweet and bitter perception. *Physiology & Behavior*, 2006;**88**: pp. 215-226.
- Rholeder, N., & Nater, U. M. Determinants of salivary α -amilase in humans and methodological considerations. *Psychoneuroendocrinology*, 2009; **34**: pp. 469-485.
- Scarano., E., Fiorita,, A., Picciotti,, P., Passali, G., Caló, L., Cabras, T., et al. Proteomics of saliva: personal experience. *Acta otorhinolaryngologica italica*, 2010; **30**, pp. 125-130.
- Schipper, R. G., Silletti, E., & Vingerhoeds, M. H. Saliva as research material: Biochemical, physicochemical and practical aspects. *Archives of oral bioloy*, 2007;**52**:pp. 1114-1135.
- Simões, C. Avaliação das alterações na composição proteica da saliva induzidas pela obesidade. *Relatório de estágio de licenciatura*. 2011; pp 1-61.

- Snyder , L. Inherited taste deficiency. *Science*, 1931;**74**: pp. 151-2.
- Spielman, A. I. Interaction of saliva and taste. 1990; **69**: pp. 838-843.
- Tepper, B. J., Christensen, C. M., & Cao, J. Development of brief methods to classify individuals by PROP taster status. *Physiology & Behavior*, 2001; **73**: pp. 571 - 577.
- Tepper BJ, White EA, Koelliker Y, Lanzara C, d'Adamo P, Gasparini P. *Ann N Y Acad Sci*. 2009 Jul;1170:126-39. Review.
- Thatcher, B. J., Doherty, A. E., Orvisky, E., Martin, B. M., & Henkin, R. I.. Gustin from Human Parotid Saliva Is Carbonic Anhydrase VI. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 1998; **250**: pp. 635-641.
- Williamson, M. (1994). The structure and function of proline-rich regions in proteins. *Biochemistry Journal*, 1994;**297**,:pp. 249-260.
- Wood, I. P., Elliston, A., Ryden, P., Bancroft, I., Roberts, I. N., & Waldron, K. W. Rapid quantification of reducing sugars in biomass hydrolysates: Improving the speed and precision of the dinitrosalicylic acid assay. *Biomass & Bioenergy*, 2012; pp. 117-121.
- Wu, Z., Wang, J., & Zhang, X. (2009). Diagnostic model of saliva protein finger print analysis of patients with gastric cancer. *World Journal Gastroenterol*, **15**, pp. 865-70.
- Zhao, L., Kirkmeyer, S. V., & Tepper, B. J. (2003). A paper screening test assesses genetic taste sensitivity to 6-n-propylthiouracil. *Physiology & Behavior*, **78**, pp. 625-633.

Anexos