

Utilização da proteómica para compreender o comportamento de ingestão

Proteomics and ingestive behaviour

E. Lamy¹, F.Capela-Silva^{1,2}, E.S. Baptista^{1,3}, G. Graça⁴,
G.Costa⁴ & A.V. Coelho^{4,5}

RESUMO

O comportamento ingestivo é regulado, entre outros, por factores afectivos, os quais determinam diferentes preferências. A escolha da dieta depende de experiências anteriores, bem como do nível de percepção gustativa, estando a saliva envolvida neste último. As proteínas salivares desempenham papéis muito diversos que incluem a lubrificação, digestão, protecção contra microorganismos e factores antinutritivos, e têm um papel decisivo na transdução do gosto. A nossa abordagem ao estudo do comportamento ingestivo utiliza a proteómica para identificar e monitorizar a expressão das proteínas salivares. A palavra proteómica é utilizada para descrever o estudo do proteoma, ou seja, a medição simultânea da totalidade de proteínas de uma matriz biológica. Temos como objectivo contribuir para uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na regulação do comportamento em pastoreio, através do estudo do proteoma salivar de cabras e ovelhas, cujas preferências gustativas diferem.

ABSTRACT

Ingestion behavior is controlled, among others, by affective factors, which lead to different preferences. Diet selection depends on animal past experience as well as taste perception, in which saliva is involved. Salivary proteins have diverse functions, which include lubrication, digestion, protection against microorganisms and antinutritional compounds and have an important role in taste transduction. Our approach to the study of feeding behavior uses proteomics to access expression profile and to identify salivary proteins. The word proteomics is used to describe the study of proteome, i.e. the simultaneous measurement of the entirety of proteins from a biological matrix. We aim to contribute to a better understanding of grazing and browsing control mechanisms through the study of sheep and goats salivary proteome, species that show different diet preferences.

¹ ICAM - Instituto de Ciências Agrárias Mediterrânicas, Universidade de Évora, 7002-554 Évora, e-mail: ecsl@uevora.pt; ²Departamento de Biologia, Universidade de Évora; ³Departamento de Zootecnia, Universidade de Évora; ⁴ITQB - Instituto de Tecnologia Química e Biológica, Universidade Nova de Lisboa

INTRODUÇÃO

O termo proteoma está associado à identificação e caracterização de um grande número de proteínas, constituintes simultâneos de uma matriz biológica (organelo, célula, organismo, fluido biológico) que são produzidas num determinado momento e sob determinadas condições. O estudo do proteoma, permite obter informação sobre os perfis de expressão das proteínas, quer referentes à sua abundância e localização, quer ainda a modificações químicas ou interações. As técnicas mais vulgarmente utilizadas são as que recorrem à separação das proteínas por electroforese bi-dimensional combinada com a sua posterior identificação através de métodos de espectrometria de massa.

Como este tipo de abordagem possibilita que, com um único ensaio, se consiga identificar e comparar o nível de expressão de um grande número de proteínas e ainda caracterizar as suas modificações pós-translacionais, o interesse pela aplicação da proteómica cresceu bastante na última década. A proteómica tem sido aplicada a uma grande diversidade de áreas de estudo, nomeadamente no estudo de diversas patologias como a diabetes (Scott *et al.*, 2005), ou diferentes tipos de cancro (Hamler *et al.*, 2004; Friedman *et al.*, 2004), em toxicologia (Aardema e MacGregor, 2002), ou ainda na pesquisa de proteínas que possam ser utilizadas como marcadores biológicos de várias doenças (Turck *et al.*, 2005; Blake, 2005). Também na produção animal começa a haver um interesse crescente na utilização da proteómica. Burgess (2004) refere a sua aplicabilidade ao estudo do sistema imunitário de espécies aviárias. Áreas como a parasitologia (de Venevelles *et al.*, 2004), reprodução (Strzpek *et al.*, 2005) e nutrição (Fuchs *et al.*, 2005) também têm beneficiado com a utilização de uma abordagem proteómica e das técnicas experimentais que lhe estão associadas.

As possibilidades decorrentes da utilização destes tipos de estudos estão, no entanto, ainda longe de serem esgotadas. Referindo-nos apenas à nutrição, várias situações poderiam beneficiar desta abordagem. Neste texto iremos referir-nos apenas ao estudo do comportamento de ingestão, processo extremamente complexo e variável. É reconhecida a capacidade que os animais têm de, em pastoreio, ajustar a ingestão, combinando os diversos alimentos que têm à disposição, de modo a ingerir uma dieta que lhes proporcione mais benefícios nutricionais ou psicológicos (Villalba & Provenza, 2005). No entanto, como a maior parte dos estudos se baseia na observação de preferências e quantidades ingeridas, este conhecimento é apenas aplicável a condições semelhantes, pouco contribuindo para compreender os mecanismos que controlam a ingestão. A utilização de técnicas experimentais que permitam avaliar e comparar a expressão proteica em determinados momentos, nomeadamente em resposta a diferentes dietas, são de grande utilidade no estudo do comportamento ingestivo. No entanto, apenas Ishihara *et al.* (2005) utilizaram uma abordagem proteómica no estudo da ingestão, através da qual obtiveram padrões de expressão de proteínas do cérebro de ratos, e compararam o seu perfil proteico quando estes foram sujeitos a regimes alimentares diferentes.

Para uma melhor compreensão dos princípios e técnicas utilizadas em estudos de proteómica recomenda-se a consulta da revisão efectuada por Dhingra *et al.* (2005).

O COMPORTAMENTO DE INGESTÃO

O comportamento de ingestão resulta da interacção de uma variedade de factores, que vão desde mecanismos homeostáticos, os quais estão relacionados com os circui-

tos de informação no cérebro e que asseguram um aporte adequado de energia e nutrientes, a mecanismos hedônicos, que têm a ver com sensações de prazer. Dentro destes últimos destacam-se os mecanismos gustativos, determinantes na escolha da dieta.

A palatabilidade é um factor determinante nos processos de escolha e ingestão dos alimentos. Este é um processo complexo que integra o odor, o sabor e a textura dos alimentos com os efeitos pós-ingestivos destes em termos de nutrientes e toxinas (Provenza, 1995). A percepção do aroma por parte dos animais resulta da recepção dos estímulos gustativos, olfactivos e tácteis por parte dos receptores sensoriais situados na cavidade bucal. Normalmente os animais apresentam preferência para os sabores doce e salgado e aversão para compostos ácidos e amargos, comportamentos estes, que parecem ter um valor adaptativo, na medida em que o sabor amargo está frequentemente associado a alcalóides, muitos deles anti-nutritivos, e o sabor ácido a produtos que ainda se encontram em fases precoces de maturação e, por isso, pouco nutritivos, enquanto que os sabores salgado e doce estão associados a nutrientes com importância para a sobrevivência.

Nos últimos anos tem-se avançado na compreensão da discriminação dos sabores a nível molecular. Foram identificados os genes para vários receptores gustativos (Lindemann, 2001). Verificou-se que existem diferenças entre as várias espécies ao nível do número e distribuição dos receptores gustativos, o que pode levar a diferentes níveis de percepção para os diferentes gostos (Miller & Whitney, 1989; Duffy & Bartoshuk, 2000). No entanto, continua por compreender o modo integrado como a informação gustativa determina o comportamento ingestivo. É igualmente reconhe-

cida a importância que a morfo-fisiologia desempenha na determinação das preferências alimentares (Hofmann, 1989). As glândulas salivares e a composição da saliva apresentam diferenças entre os vários grupos de animais com comportamentos de ingestão diferentes (Kay *et al.*, 1980). As espécies que estamos a estudar, ovinos e caprinos, constituem um exemplo de espécies que, apesar de estarem ligadas filogeneticamente, apresentam diferenças marcadas ao nível da selecção dos alimentos. As ovelhas são animais que se alimentam à base de monocotiledóneas (*grazers*), enquanto que as cabras apresentam uma dieta cuja composição varia de acordo com a disponibilidade de alimento, predominando as monocotiledóneas ou as dicotiledóneas, na sua dieta, consoante a época do ano, apresentando assim um comportamento intermédio entre *grazers* e *browsers* e tendo por isso sido classificadas de *intermediate feeders*.

SALIVA

A saliva é maioritariamente produzida por 3 pares de glândulas salivares (parótidas, submandibulares e sublinguais) ajudadas por numerosas glândulas salivares de menores dimensões, entre as quais as glândulas labiais e as glândulas de von Ebner. A secreção salivar é controlada pelos ramos simpático e parassimpático do sistema nervoso autónomo. Todas as condições, extrínsecas e intrínsecas ao animal, que afectem os sistemas adrenérgico e colinérgico vão produzir alterações na taxa de secreção de saliva e/ou na sua composição. Os estímulos que afectam a secreção de saliva podem ser intra-orais, como é o caso do sabor ou de estímulos mecânicos, ou extra-orais, tais como factores ambientais, odor ou mesmo factores psíquicos, como

expectativas (Christensen e Navazesh, 1984). A estimulação mecânica provocada pelos alimentos induz a secreção de saliva (Richardson & Feldman, 1986). Estímulos químicos diferentes, como são os diferentes sabores, conduzem à produção de fluxos de saliva diferentes. Alimentos com características que irritam a cavidade oral também parecem induzir um intenso fluxo de saliva, o que pode servir para a sua protecção (Martin & Pangborn, 1971) Existe, assim, uma relação mútua entre a secreção de saliva e a composição da dieta. O tipo de alimento não só influencia a produção de saliva, como esta, por sua vez, afecta a percepção sensorial dos alimentos (Matsuo, 2000).

De entre os constituintes da saliva, as proteínas salivares são componentes com funções muito diversas, entre as quais se destaca um papel decisivo ao nível da ingestão. As proteínas que se encontram na saliva são, na sua maioria, sintetizadas *de novo* nas glândulas salivares. No entanto, na saliva também se podem encontrar proteínas cuja proveniência são microorganismos (principalmente bactérias) (McArthur & Jacques, 2003), sangue (Huang, 2004) ou células e tecidos da cavidade oral (Kojima *et al.*, 2000). Algumas proteínas salivares podem influenciar a lubrificação e consequentemente a percepção de certos atributos dos alimentos, tais como a maciez ou a adstringência (Noble, 1995). Certas proteínas salivares são induzidas em resposta à ingestão de certas substâncias presentes nos alimentos, com o objectivo de suprimir os efeitos negativos provocados por estas. É o caso de algumas cistatinas salivares que, em condições normais, estão ausentes na saliva dos roedores, mas que são induzidas pela ingestão de alimentos “agressivos” para a mucosa oral (Bedi, 1991). Do mesmo modo, a ingestão de substâncias com a propriedade de inibir a

detecção do gosto doce induz, nos ratos, a produção de proteínas salivares com afinidade para essas substâncias, servindo como defesa (Katsukawa *et al.*, 1999). Um dos grupos de proteínas salivares que aparece ligado ao tipo de dieta dos animais é o grupo das proteínas com afinidade para taninos. A saliva de animais cuja dieta habitual inclui níveis elevados de taninos apresenta na sua constituição este tipo de proteínas, enquanto que noutros animais a sua produção é induzida pelo aumento do nível destes compostos secundários nos alimentos. Em humanos e ratos, as proteínas salivares ricas em prolina (PRPs) são as mais apontadas como tendo uma elevada afinidade para os taninos, servindo como defesa para o animal, ao formarem complexos estáveis com esses compostos, impedindo-os de exercer efeitos nefastos para o animal (Lu & Bennick, 1998; Baxter *et al.*, 1997). Os humanos apresentam ainda as histatinas (proteínas salivares ricas em histidina), que também têm elevada afinidade para os taninos (Wroblewski *et al.*, 2001; Naurato *et al.*, 1999; Yan & Bennick, 1995), mas a sua presença ainda não foi referida na saliva de outras espécies animais.

PROTEÓMICA, SALIVA E COMPORTAMENTO DE INGESTÃO

O proteoma é um sistema altamente dinâmico, uma vez que as proteínas estão sujeitas a constante biossíntese, modificação e degradação. Ainda que os fenómenos de tradução se iniciem com os RNA mensageiros, muitas vezes não se consegue estabelecer uma relação entre os níveis destes e os das proteínas por eles codificadas. Para além disso, a variedade de proteínas expressas é muitas vezes superior à variedade de RNA mensageiro, devido a modificações pós-transcripcionais e pós-traducionais (fos-

forilações, glicosilações, proteólise), que podem ser determinantes para a função das proteínas, pelo que a informação obtida a partir da análise do RNA mensageiro se torna limitada.

A utilização da proteômica no estudo da saliva humana tem vindo a crescer de interesse, de há uns anos para cá, com resultados promissores (Amado *et al.*, 2005). A análise das proteínas da saliva é atractiva, na medida em que a saliva é um fluído cuja recolha é rápida e não invasiva. A maior parte da investigação que tem sido feita, ao nível da saliva, recorrendo a técnicas de proteômica, tem sido realizada em humanos, principalmente em estudos relacionados com a saúde da cavidade oral (Huang, 2004), ou com a identificação de biomarcadores salivares que possam servir para monitorizar o estado de saúde dos indivíduos ou para diagnosticar doenças. Algumas das proteínas identificadas na saliva humana incluem: cistatinas, lizozimas, PRPs ácidas, básicas e glicosiladas, imunoglobulinas, peroxidases, histantinas, entre outras. Para uma listagem mais exaustiva e completa das proteínas salivares identificadas em humanos ver Amado *et al.* (2005) e Hu *et al.* (2005).

Informação referente ao proteoma de outras espécies de mamíferos é praticamente inexistente, se exceptuarmos a utilização de animais como “modelos” humanos, nomeadamente roedores e suínos (Amasaki *et al.* 2001; Williams *et al.* 1999a; Williams *et al.* 1999b). Sendo a saliva um fluído complexo, constituído por uma variedade de proteínas que podem variar, qualitativa e quantitativamente, de acordo com vários factores relacionados com a ingestão, técnicas que permitam separar e identificar essas proteínas são poderosos aliados no estudo do comportamento ingestivo. O conhecimento da composição proteica da saliva, bem como a monitorização das alterações indu-

zidas por factores ambientais, nomeadamente através da composição da dieta, podem contribuir para uma melhor compreensão da fisiologia digestiva e da capacidade adaptativa dos animais. Apesar desta evidência, e dos herbívoros constituírem um grupo de animais com uma dieta variável e dependente das espécies vegetais disponíveis, a aplicação das técnicas de proteômica ao estudo da saliva destes animais nunca foi realizada.

Tal como foi referido anteriormente, cabras e ovelhas escolhem alimentos com características diferentes, em pastoreio. Uma das grandes diferenças na composição desses alimentos regista-se nos níveis de metabolitos secundários presentes, com as cabras a ingerirem uma maior quantidade de substâncias consideradas adstringentes e amargas, nomeadamente taninos, comparativamente às ovelhas. Os humanos e algumas espécies animais, nomeadamente ratos, apresentam uma família de proteínas salivares, as PRPs, as quais têm uma afinidade particular para estabelecer ligações a taninos. Nalgumas espécies essas proteínas são sintetizadas em resposta a um aumento do nível desses compostos na dieta, sendo consideradas como “linha de defesa” contra os efeitos nefastos desses compostos. Estudos realizados em ruminantes sugerem que a produção de proteínas com afinidade para taninos depende dos níveis e tipos de taninos presentes nas dietas normalmente consumidas por esses animais. Desta forma, Hagerman e Robbins (1993) sugerem a presença constitutiva de proteínas com afinidade para taninos na saliva dos *browsers*, a síntese dessas proteínas na saliva de *intermediate feeders*, induzida por níveis elevados de taninos na dieta, e a sua ausência na saliva dos *grazers*.

O trabalho que estamos a desenvolver envolve o estudo do proteoma da saliva parotídea destas duas espécies domésticas de ruminantes.

A metodologia analítica que utilizamos, inclui a separação das proteínas da saliva em electroforese em gel de poli(acrilamida) a duas dimensões e a análise do padrão de separação, seguida de identificação das proteínas por espectrometria de massa, através de espectros adquiridos num equipamento do tipo MALDI-TOF (*matrix assisted laser desorption ionization – time of flight*). A separação dos extractos de proteínas salivares por electroforese bidimensional implica uma primeira separação por focagem isoelectrica, em função da carga das proteínas, e uma segunda separação em condições desnaturantes, em função da sua massa molecular. Os géis obtidos são posteriormente analisados através da utilização de *software* que possibilita uma comparação do perfil das proteínas expressas em cada uma das diferentes condições. Depois da análise de imagem, as proteínas de interesse são identificadas. Os *spots* correspondentes a essas proteínas são cortados e cada uma das proteínas digerida *in gel*, utilizando uma protease específica. A massa dos péptidos resultantes da digestão é determinada por espectrometria de massa. O padrão do espectro de massa é característico de cada proteína e funciona, por isso, como uma espécie de impressão digital da proteína. Comparando o conjunto das massas de péptidos determinado experimentalmente com as massas dos digeridos teóricos das sequências de proteínas depositadas em bases de dados, é possível identificar as proteínas. Esta busca nas bases de dados é facilitada pela utilização de *software* específico. A estratégia descrita para a identificação de proteínas é denominada *peptide mass fingerprinting*.

Esta abordagem irá permitir-nos conhecer, numa primeira fase, os padrões proteicos característicos da saliva de cada uma das espécies animais referidas, o que poderá ajudar a compreender melhor as decisões, em termos de selecção dos alimentos, por

parte de cada uma delas. Para além disso, pretendemos comparar o proteoma da saliva de cada uma das espécies, quando sujeitas a dietas diferentes, nomeadamente ao nível de compostos fenólicos, de modo a investigar se induzem alterações na composição proteica da saliva que possam explicar os diferentes comportamentos de ingestão.

Em trabalhos preliminares (Lamy *et al.*, 2003), verificámos a existência de diferenças entre ovinos e caprinos no que diz respeito ao perfil proteico da saliva das glândulas parótidas. Qualquer um destes perfis difere também dos existentes na bibliografia para a saliva proveniente das glândulas parótidas de humanos. Algumas das proteínas identificadas até ao momento incluem albuminas, lactoferrinas, anidrase carbónica VI, enolases, entre outras. As proteínas correspondentes às diferenças detectadas ainda não foram identificadas, continuando-se a desenvolver o trabalho laboratorial necessário.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aardema, M.J. & MacGregor, J.T. 2002. Toxicology and genetic toxicology in the new era of "toxicogenomics": impact of "-omics" technologies. *Mutat Res*, **499**: 13-25.
- Amado, F.M., Vitorino, R.M., Domingues, P.M., Lobo, M.J. & Duarte, J.A. 2005. Analysis of the human saliva proteome. *Expert Rev Proteomics*, **2**: 521-539.
- Amasaki, T., Amasaki, H. & Nagasao, J. 2001. Immunohistochemical localization of carbonic anhydrase isoenzymes in salivary glands and intestine in adult and suckling pigs. *J Vet Med Sci*, **63**: 1147-1149.
- Baxter, N.J., Lilley, T.H., Haslam, E. & Williamson, M.P. 1997. Multiple inter-

- actions between polyphenols and salivary proline-rich protein repeat result in complexation and precipitation. *Biochemistry*, **36**: 5566-5577.
- Bedi, G.S. 1991. The effect of adrenergic agonists and antagonists on cysteine-proteinase inhibitor (cystatin) in rat saliva. *Arch Oral Biol*, **36**: 611-618.
- Blake, C.A. 2005. Physiological proteomics: cells, organs, biological fluids, and biomarkers. *Exp Biol Med (Maywood)*, **230**: 785-786.
- Burgess, S.C. 2004. Proteomics in the chicken: tools for understanding immune responses to avian diseases. *Poult Sci*, **83**: 552-573.
- Christensen, C.M. & Navazesh, M. 1984. Anticipatory salivary flow to the sight of different foods. *Appetite*, **5**:307-315.
- de Venevelles, P., Chich, J.F., Faigle, W., Loew, D., Labbe, M., Girard-Misguich, F. & Pery, P. 2004. Towards a reference map of *Eimeria tenella* sporozoite proteins by two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry. *Int J Parasitol*, **34**: 1321-1331.
- Dhingra, V., Gupta, M., Andacht, T. & Fu, Z.F. 2005. New frontiers in proteomics research: a perspective. *Int J Pharm*, **299**: 1-18
- Duffy, V.B. & Bartoshuk, L.M. 2000. Food acceptance and genetic variation in taste. *J Am Diet Assoc*, **100**: 647-55
- Friedman, D.B., Hill, S., Keller, J.W., Merchant, N.B., Levy, S.E., Coffey, R.J. & Caprioli, R.M. 2004. Proteome analysis of human colon cancer by two-dimensional difference gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics*, **4**: 793-811.
- Fuchs, D., Winkelmann, I., Johnson, I.T., Mariman, E., Wenzel, U. & Daniel, H. 2005. Proteomics in nutrition research: principles, technologies and applications. *Br J Nutr*, **94**: 302-314.
- Hagerman, A.E. & Robbins, C.T. 1993. Specificity of tannin-binding salivary proteins relative to diet selection by mammals. *Can J Zool*, **71**: 628-633
- Hamler, R.L., Zhu, K., Buchanan, N.S., Krenunin, P., Kachman, M.T., Miller, F.R. & Lubman, D.M. 2004. A - dimensional liquid-phase separation method coupled with mass spectrometry for proteomic studies of breast cancer and biomarker identification. *Proteomics*, **4**: 562-577.
- Hofmann, R.R. 1989. Evolutionary steps of ecophysiological adaptation and diversification of ruminants: comparative view of the digestive system. *Oecologia*, **78**: 443-45
- Huang, C.M. 2004. Comparative proteomic analysis of human whole saliva. *Arch Oral Biol*. **49**: 951-62
- Hu, S., Xie, Y., Ramachandran, P., Ogazalek Loo, R.R., Li, Y., Loo, J.A., & Woong, D.T. 2005. Large-scale identification of proteins in human salivary proteome by liquid chromatography/mass spectrometry and two-dimensional gel electrophoresis-mass spectrometry. *Proteomics*, **5**: 174-28
- Ishihara, K., Nakata, K., Yamagishi, N., Iwasaki, S., Kiriike, N. & Hatayama, T. 2005. A comparative proteomic analysis of the rat brain during rebound hyperagia induced by space-restriction. *Mol Cell Biochem*, **276**: 21-29.
- Katsukawa et al. 1999 Induction of salivary gurrmarin-binding proteins in rats fed gymnema-containing diets. *Chem. Senses*, **24**: 387-392.
- Kay, R.N.B, Engelhardt, W.V. & White, R.G. 1980. The digestive physiology of wild ruminants. In: *The Digestive Physiology and Metabolism in Ruminants*, **36**: 743-761. Ruckebusch, Y. & Thivend, P. (Ed.) MTP Press Limited, Lancaster, UK.

- Kojima, T., Andersen, E., Sanchez, J.C., Wilkins, M.R., Hochstrasser, D.F., Pralong, W.F. & Cimasoni, G. 2000. Human gingival crevicular fluid contains MRP8 (S100A8) and MRP14 (S100 A9), two calcium-binding proteins of the S100 family. *J Dent Res*, **79**: 740-7.
- Lamy, E., da Costa, G., Coelho A.V., Capela e Silva, F. & Sales Baptista, E. (2003) The effect of polyphenols in mammalian herbivores saliva composition. *9th International European Association for Veterinary Pharmacology and Toxicology Congress*. 14-17 July, Lisboa, Portugal. (Poster G-34).
- Lindemann, B. 2001. Receptores and transduction in taste. *Nature*, **413**: 219-225.
- Lu, Y. & Bennick, A. 1998. Interaction of tannin with human salivary proline-rich proteins. *Arch Oral Biol*, **43**: 717-728.
- Mcarthur, D.J. & Jacques, N.A. 2003. Proteome analysis of oral pathogens *J Dent Res*, **82**: 870-6
- Martin, S. & Pangborn, R.M. 1971. Human parotid secretion in response to ethyl alcohol. *J Dent Res*, **50**: 485-490.
- Matsuo, R. 2000. Role of saliva in the maintenance of taste sensitivity. *Crit Rev Oral Biol Med*, **11**: 216-229.
- Miller, I.J. Jr. & Whitney, G. 1989. Sucrose octaacetate-taster mice have more valiate taste buds than non-tasters. *Neurosci Lett*, **100**: 271-5
- Narauto, N., Wong, P., Lu, Y., Wroblewski, K. & Bennick, A. 1999. Interaction of tannin with human salivary histatins. *J Agric Food Chem*, **47**: 2229-2234.
- Noble, A.C. 1995. Application of time-intensity procedures for the evaluation of taste and mouthfeel. *Am J Enol Vitic*, **46**:128-133.
- Provenza, F.D. 1995. Postingestive feedback as an elementary determinant of food preference and intake in ruminants. *J Range Manage*, **48**: 2-17.
- Richardson, C.T. & Feldman, M. 1986. Salivary response to food in humans and its effect on gastric acid secretion. *Am J Physiol*, **250**:G85-G91.
- Scott, E.M., Carter, A.M. & Findlay, J.B. 2005. The application of proteomics to diabetes. *Diab Vasc Dis Res*, **2**: 54-60.
- Strzezek, J., Wysocki, P., Kordan, W. & Kuklinska, M. 2005. Proteomics of boar seminal plasma current studies and possibility of their application in biotechnology of animal reproduction. *Reprod Biol*, **5**: 279-290.
- Turck, C.W., Macne, G., Sayan-Ayata, E., Jacob, A.M., Ditzen, C., Kronsbein, H., Birg, I., Doertbudak, C.C., Haegler, K., Lebar, M., Teplytska, L., Kolb, N., Uwaje, N. & Zollinger, R. 2005. The quest for brain disorder biomarkers. *J Med Invest*, **52 Suppl**: 231-235.
- Villalba, J.J. & Provenza, F.D. 2005. Foraging in chemically diverse environments: energy, protein and alternative foods influence ingestion of plant secondary metabolites by lambs. *J Chem Ecol*, **31**: 123-138.
- Williams, K.M., Ekström, J. & Marshall, T. 1999a. High-resolution electrophoretic analysis of rat parotid salivary proteins. *Electrophoresis*, **20**: 1373-1381.
- Williams, K.M., Ekström, J. & Marshall, T. 1999b The protein composition of ferret parotid saliva as revealed by high-resolution electrophoretic methods. *Electrophoresis*, **20**: 2818-23.
- Wroblewski, K., Muhandiram, R., Chakrabarty, A. & Bennick, A. 2001. The molecular interaction of human salivary histatins with polyphenolic compounds. *Eur J Biochem*, **268**: 4384-4397.
- Yan, Q. & Bennick, A. 1995. Identification of histatins as tannin-binding proteins in human saliva. *Biochem J*, **311**: 341-347.