

Condiciones óptimas de manipulación para la cuantificación de fibronectina en saliva

M^a Carmen Llana Puy ⁽¹⁾, Consuelo Montañana Llorens ⁽²⁾, Leopoldo Forner Navarro ⁽³⁾

(1) Estomatólogo. Unidad de Odontología Preventiva de Área. Servicio Valenciano de Salud. Profesora de Odontología. Facultad de Ciencias Experimentales y de la Salud. Universidad Cardenal Herrera-CEU

(2) Becaria de Investigación

(3) Profesor Titular de Patología y Terapéutica Dental. Departamento de Estomatología. Facultad de Medicina y Odontología. Universidad de Valencia. España

Correspondencia:

M^a Carmen Llana Puy

Guillem de Castro N^o 44, 3^o

46001 Valencia

Tf. 963924018

E-Mail: llena@uch.ceu.es

Recibido: 5-01-2003 Aceptado: 18-05-2003

Llana-Puy MC, Montañana-Llorens C, Forner-Navarro L. Condiciones óptimas de manipulación para la cuantificación de fibronectina en saliva. *Med Oral* 2004;9:191-6.

© Medicina Oral S. L. C.I.F. B 96689336 - ISSN 1137 - 2834

RESUMEN

Introducción: La fibronectina (Fn) es una glucoproteína presente en múltiples fluidos y tejidos orgánicos, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas. También en la saliva puede detectarse aunque en muy pequeñas cantidades y frecuentemente en cadenas fragmentadas, induce agregación bacteriana y sus niveles se reducen cuando aumentan los niveles de bacterias cariogénicas o periodontopatógenas. La capacidad infectiva de la saliva de los pacientes infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) se ha relacionado con los niveles de esta proteína. En algunas enfermedades crónicas de la mucosa oral como es el liquen plano, la concentración de Fn salivar se encuentra reducida. También su cuantificación varía en presencia de algunos tumores como el carcinoma oral de células escamosas, aunque no puede considerarse un factor específico.

Objetivo: Debido a la baja concentración de Fn en la saliva y a su labilidad en la forma soluble, las condiciones de recogida y conservación de las muestras son extremadamente importantes, por ello nos proponemos en el presente trabajo estandarizar dichas condiciones con el fin de poder cuantificarla de manera óptima.

Material y método: Se determinó la concentración de Fn en saliva humana de 20 personas sanas de edades comprendidas entre 28 y 54 años mediante técnica de ELISA, comparando la concentración de la proteína en muestras frescas, conservadas 24 h a 4°C, o congeladas a -40°C durante diferentes periodos de tiempo.

Resultados y conclusiones: Tras comparar diferentes formas de conservación de las muestras de saliva, observamos que las condiciones óptimas son: recoger las muestras en tubos de vidrio,

cuantificarlas inmediatamente tras su recogida o como máximo 24 horas después, conservándolas a 4°C. La congelación y posterior descongelación para su cuantificación induce pérdidas de hasta el 60 % de la proteína.

Palabras clave: *Fibronectina, saliva, cuantificación, almacenamiento*

INTRODUCCION

La fibronectina (Fn) es una glucoproteína multifactorial que se encuentra de forma soluble en la sangre, la saliva y en otros fluidos orgánicos (1,2) y de forma insoluble interactuando con diferentes componentes de la matriz extracelular. Sus niveles están positivamente relacionados con patología infecciosa aguda, así como con procesos crónicos como es el caso de la cirrosis hepática o el hepatocarcinoma (3,4). Está compuesta por dos subunidades de 230 KDa unidas por dos puentes disulfuro con una compleja estructura subdividida en una serie de pequeños dominios, cada uno de los cuales es aparentemente responsable de alguna de sus funciones, dos de ellos son los encargados de la unión al colágeno y a la fibrina así como a las células eucarióticas, esta habilidad reside en el N-terminal y en el dominio central de la secuencia respectivamente (5,6).

La Fn es un factor inespecífico de defensa en la saliva como la lisozima, la lactoferrina, la beta 2 microglobulina, la histidina, la mucina, o el sistema de las peroxidasas (7), juega un papel fundamental en los mecanismos de unión celular, es capaz de unirse a las bacterias (8-12) y a la hidroxiapatita, contribuye a la formación de la película adquirida y de la placa bacteriana (13). Puede encontrarse también de forma soluble en la saliva

total o en la saliva parotídea, submaxilar o sublingual, así como en el fluido crevicular (14).

Cuando la Fn u otros factores de unión celular disminuyen, se reduce la capacidad de agregación bacteriana de la saliva y cuando se administran a una saliva previamente depleccionada se restaura la interacción entre la saliva y las bacterias presentes en ella como los *Streptococcus* (15), por todo ello se le considera un factor responsable de la agregación bacteriana (16). En la saliva de pacientes con enfermedad periodontal, los niveles de Fn son inferiores que los encontrados en pacientes sanos. Conocemos que esta proteína es una de las responsables de la unión a las fimbrias de la *Porfiromona Gingivalis* (17). Así mismo, se ha demostrado una correlación inversa entre los niveles de *Streptococcus mutans* y la concentración de Fn soluble en la saliva. (18). Un estudio reciente ha demostrado que la secuencia de aminoácidos Qrg-Gly-Asp (RGD) es el lugar de unión de la proteína para el *Streptococcus mitis* (19).

La Fn interactúa también con las glicoproteínas de la cápsula del virus de la inmunodeficiencia humana (HIV), pudiendo intervenir de manera positiva en la reducción de la transmisión del mismo (20, 21). La muerte celular en los cultivos de fibroblastos inducida por el peróxido de hidrógeno se ve frenada por la incorporación de Fn a dichos cultivos (22). En pacientes con liquen plano oral, los niveles de Fn salivar están reducidos con respecto a pacientes sanos (23). Una isoforma de ésta proteína obtenida por glicosilación de la Fn normal y algunos segmentos extra de la proteína están fuertemente correlacionados con un elevado número de tumores, incluyendo el carcinoma oral de células escamosas, pero sus niveles en saliva no proporcionan ningún especificidad con respecto al tumor (24).

Los niveles de Fn en saliva y otros fluidos humanos son muy bajos (25), y su manipulación extremadamente crítica, por ello el objetivo de este trabajo es revisar las condiciones de manipulación y almacenamiento de las muestras en condiciones óptimas que nos permitan determinar adecuadamente los niveles de dicha proteína.

MATERIAL Y METODO

Se recogieron entre 7 y 10 ml de saliva estimulada con parafina a 20 personas de edades comprendidas entre los 28 y 54 años de edad. Las muestras se distribuyeron en 7 alíquotas, 4 de las cuales fueron congeladas en tubos de vidrio con nitrógeno líquido tras su recogida y almacenadas a -40°C , una fue recogida en un tubo de vidrio y procesada inmediatamente para la cuantificación de la proteína, otra fue almacenada a 4°C durante 24 horas en un tubo de vidrio hasta su utilización y una tercera fue conservada como la anterior pero en un tubo de plástico. Las muestras congeladas fueron analizadas transcurridas 1, 2, 4 y 8 semanas respectivamente, previa descongelación a 37°C y conservación a 4°C durante el procesado. Como proteína estándar se utilizó Fn humana plasmática (Boheringer Mannheim) diluida en agua destilada y congelada a -40°C . Para cuantificar la Fn se utilizó una técnica ELISA modificada. Se utilizó el método de doble anticuerpo descrito por Lamberts y cols. (26), utilizando anticuerpos anti Fn humana plasmática

policlonal, Anti IgG AP-conjugada de conejo (Promega Corp.), dietanolamina al 9,7 % a un pH de 9,8 (Sigma Aldrich), MgSO_4 (1mM) (Merck Igoda S.A) y p-nitrofenol (1 mM) para visualizar el reconocimiento de la Fn por los anticuerpos. El método fue modificado como se expresa a continuación: la Fn plasmática humana fue diluida en PBS para aplicar duplicados en un rango de 10 - 250 ng/ml con el fin de obtener concentraciones desde 1/2 (p/v) a 1/4, 1/10 y 1/24 (v/v). Las muestras fueron colocadas en placas (Nunc MaxiSorp) e incubadas durante 12 horas a 4°C con los anticuerpos correspondientes, posteriormente fueron lavadas con BSA libre de Fn (25). La absorbancia fue medida a 405 nm después de 40 minutos en un lector de ELISA (Novapath BIORAD Laboratories S.A).

Se determinó el porcentaje de pérdida de proteína en las diferentes condiciones considerando la determinación inmediata como el 100%, se calcularon los valores medios y los intervalos de confianza al 95% para cada grupo de almacenamiento y se compararon entre si mediante el análisis de la varianza, utilizando el test de Duncan para la comparación de los grupos dos a dos.

RESULTADOS

Se realizó una curva estándar para la Fn plasmática humana con tres experimentos individuales y con tres ensayos para cada concentración utilizando el protocolo ELISA descrito anteriormente. Como se puede ver en la figura 1, se observa una respuesta lineal para las concentraciones comprendidas entre 10 y 100 ng/ml con un coeficiente de regresión de Spearman de 0,88.

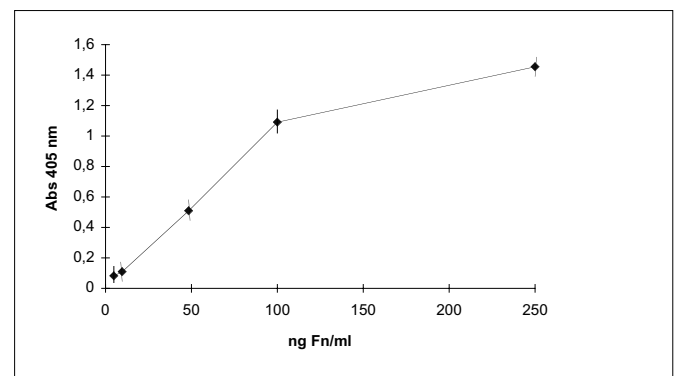


Fig. 1. Curva estándar para las diferentes concentraciones ensayadas. Curva estándar para las concentraciones comprendidas entre 10 y 250 ng/ml de Fn plasmática humana. Cada punto representa el valor medio obtenido tras la medición de tres ensayos diferentes. (n=9) (r = 0,88).

Se cuantificaron los valores de proteína para cada una de las 20 muestras y para cada una de las formas de conservación (N=120) y se observó que para las muestras conservadas durante 24 horas a 4°C , se producía una pérdida del 10 %, mientras que si las muestras se almacenaban en tubos de plástico, las pérdidas eran superiores; así mismo cuando eran congeladas aun conservándolas en tubos de vidrio, se producían pérdidas de

proteína en un rango entre el 40 y el 60 % como se observa en la figura 2.

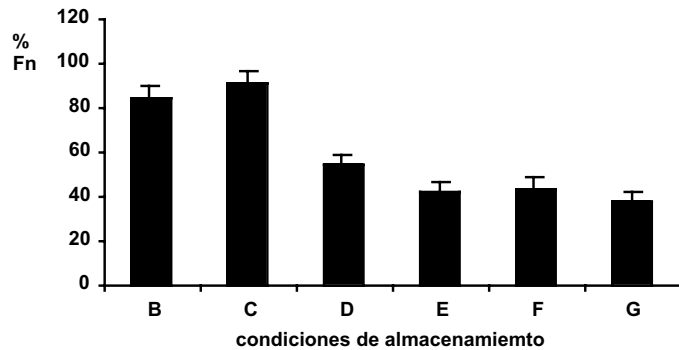


Fig. 2. Porcentaje de pérdida de proteína según las condiciones de conservación. Porcentaje de pérdida de Fn en cada una de las condiciones de almacenamiento con respecto a la cuantificación inmediata considerada el 100%.

B: Muestras conservadas 24 h a 4°C en tubos de plástico
 C: Muestras conservadas 24 h a 4°C en tubos de vidrio
 D, E, F, G: Muestras conservadas a -40 °C en tubos de vidrio durante 1, 2, 4 y 8 semanas respectivamente

La tabla 1 muestra los valores medios y los intervalos de confianza al 95 % para cada condición de almacenamiento, no encontrándose diferencias significativas entre los niveles de proteína medidos inmediatamente tras su recogida y los obtenidos tras 24 horas de almacenamiento en un tubo de vidrio a 4°. Ambos grupos muestran diferencias estadísticamente significativas con todos los demás.

	Media de Fn ng/ml	IC at 95 %
Cuantificación inmediata	127,41+	66,50 - 188,32
Almacenamiento 24 h, 4°C en tubos de plástico	114,03 +	2,75 - 225,30
Almacenamiento 24 h, 4°C en tubos de vidrio	123,54 *	64,85 - 182,23
Congeladas 1 semana	72,74 +*	44,05 - 101,43
Congeladas 2 semana	56,09 + *	31,06 - 81,12
Congeladas 4 semana	58,16 + *	31,67 - 84,66
Congeladas 8 semana	50,32 + *	26,69 - 74,35

Tabla 1. Valores medios e intervalos de confianza para cada una de las formas de conservación.

+, * Representa los grupos entre los que se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

DISCUSION

Los resultados obtenidos muestran importantes pérdidas de Fn inmunoreactiva en saliva almacenada con los sistemas habituales de conservación y almacenamiento, este hecho ha sido demostrado por otros autores en muestras de diferentes fluidos orgánicos (26), pero el alto porcentaje de pérdidas en la saliva es un hecho que se debe de considerar de cara a la manipulación cuidadosa de las muestras.

La conservación en plástico de las muestras o la simple manipulación de la saliva con instrumental plástico favorece la pérdida de proteína, ya que ésta se coapta en las paredes del tubo. La conservación durante 24 horas en tubo de vidrio a 4°C produce pérdidas poco apreciables, mientras que cualquier otra forma de conservación de las evaluadas produce pérdidas muy importantes.

El almacenamiento a -40°C, y su posterior descongelación proporciona pérdidas muy importantes, probablemente más relacionadas con el proceso de descongelación que con la propia congelación de las muestras. También es posible que la presencia de factores de degradación de la proteína presentes en la saliva total (27) y la conocida labilidad de la proteína en presencia de agua (28) den como resultado la incapacidad de los anticuerpos utilizados en el ensayo para reconocerla. La gran capacidad de la proteína para unirse a las células y a la matriz extracelular puede afectar a esta gran reducción durante el proceso de descongelación.

Un hecho importante es que el antisero de conejo permite la unión a seis fracciones de la proteína (230, 200, 110, 85, 75 y 65 KDa), así como a la proteína completa, mientras que el antisero monoclonal de ratón reconoce solo la molécula de 230 KDa que no está presente en la saliva total (29), este aspecto es sumamente importante en cuanto a la metodología de cuantificación de la proteína, ya que con antisero monoclonal de ratón, no podríamos detectarla.

Como conclusión podemos decir que la recogida de muestras de saliva para cuantificar Fn debe de realizarse en tubos de vidrio y que las muestras deben procesarse como máximo transcurridas 24 horas de su recogida y durante éste tiempo deben conservarse a 4°C. La congelación y posterior descongelación de las muestras produce pérdidas de hasta el 60 % de la proteína con respecto a los valores iniciales.

ENGLISH

Optimal assay conditions for quantifying fibronectin in saliva

LLENA-PUY MC, MONTAÑANA-LLORENS C, FORNER-NAVARRO L.
OPTIMAL ASSAY CONDITIONS FOR QUANTIFYING FIBRONECTIN IN SALIVA. MED ORAL 2004;9:191-6.

ABSTRACT

Introduction: Fibronectin (Fn) is a glycoprotein that is present in many body fluids and tissues in both physiological and pathological conditions. It can also be detected in the saliva, although only in very small quantities and frequently in broken chains. It induces bacterial aggregation and its levels fall when those of cariogenic or periodontal pathogenic bacteria rise. The infective capacity of the saliva of patients infected by human immunodeficiency virus (HIV) has been linked to the levels of this protein. In some chronic conditions of the oral mucosa, such as oral lichen planus, the concentration of salivary fibronectin is lower than usual. Fibronectin quantity also varies in the presence of some tumours, such as oral squamous cell carcinoma, although it cannot be considered a specific factor.

Aims: Due to the low Fn concentration in saliva and its lability in the soluble form, sample collection and conservation conditions are extremely important. The aim of this study is therefore to standardise these conditions so that the Fn can be quantified in an optimum manner.

Materials and methods: The Fn concentration in human saliva was determined in 20 healthy subjects aged between 28 and 54 by means of the ELISA technique and the concentration of the protein in fresh samples kept at 4°C for 24 hours was compared with that of frozen samples kept at -40°C for different periods of time.

Results and Conclusions: After comparing different ways of conserving the saliva samples, we found that the optimum conditions were to collect the samples in glass tubes and to quantify them immediately after collection or conserve them at 4°C and quantify them within a maximum of 24 hours. Freezing and later thawing for quantification induced losses of up to 60% of the protein.

Key words: *Fibronectin, saliva, quantification, storage*

INTRODUCTION

Fibronectin (Fn) is a multifactor glycoprotein that is found in soluble form in the blood, saliva and other body fluids (1, 2), while the insoluble form interacts with several extracellular matrix components. Fn levels are positively correlated to acute infectious pathology as well as to chronic processes such as

cirrhosis of the liver or liver carcinoma (3, 4). Fn is composed of two 230 KDa sub-units linked by two disulphide bonds with a complex structure, subdivided into a series of small domains, each of which ONE is apparently responsible for certain of its functions. Two of these, the N-terminal and the central domain of the sequence respectively, are in charge of binding to the collagen and fibrin and to the eukaryotic cells (5, 6).

Fn is a non-specific defence factor in saliva, like lysozyme, lactoferrin, beta 2 microglobulin, histidin, mucin, or the peroxidase system (7). It plays an essential role in cell-binding mechanisms, is capable of binding to bacteria (8-12) and to hydroxyapatite and contributes to acquired pellicle and bacterial plaque formation (13). It can also be found in soluble form in the total saliva or in the parotid, submaxillary or sublingual saliva, as well as in the crevicular fluid (14).

The bacterial aggregation capacity of saliva is lessened when the Fn level or other cell binding factors decreases and administering them to a previously depleted saliva restores the interaction between the saliva and the bacteria present in it, such as *Streptococcus* spp (15). Consequently, Fn is considered to be a factor that is responsible for bacterial aggregation (16). Fn levels in the saliva of patients with periodontal disease are lower than in healthy patients. We know that this protein is one of the factors responsible for *Porphyromona gingivalis* fimbriae binding (17). An inverse correlation between *Streptococcus mutans* levels and the concentration of soluble Fn in the saliva has also been shown to exist (18). A recent study has shown that the Qrg-Gly-Asp (RGD) amino acid sequence is the protein's binding domain for *Streptococcus mitis* (19).

Fn also interacts with the glycoproteins of the human immunodeficiency virus (HIV) capsule and can have a positive effect in reducing the transmission of this virus (20, 21). Hydrogen peroxide induced cell death in fibroblast cultures is slowed when Fn is added to these cultures (22). In patients with oral lichen planus, the levels of salivary Fn are lower than in healthy patients (23). An isoform of this protein obtained by glycosylation of normal Fn and some extra segments of the protein is strongly correlated with a large number of tumours, including oral squamous cell carcinoma, but its levels in saliva do not exhibit any specificity in relation to the tumour (24).

Fn levels in saliva and other human fluids are very low (25) and sample handling is critical. Consequently, the aim of this study is to review the optimum conditions for sample handling and storage in order to permit an appropriate determination of the levels of this protein.

MATERIALS AND METHODS

Between 7 and 10 ml of paraffin stimulated whole saliva were collected from 20 subjects aged between 28 and 54 years. The samples were divided into 7 aliquots. Four were collected in glass tubes, frozen immediately with liquid nitrogen and stored at -40°C, one was collected in a glass tube and processed immediately to quantify the protein, another was stored in a glass tube at 4°C for 24 hours before being used and the last was stored in the same way but in a plastic tube. The frozen samples were analysed at 1, 2, 4 and 8 weeks respectively. After

thawing at 37°C, they were kept at 4°C while being processed. Human plasma Fn (Boheringer Mannheim), diluted in distilled water and frozen at -40°C, was used as the standard protein.

A modified ELISA technique was used to quantify the Fn. The double antibody method described by Lamberts et al. (26) was used to identify Fn recognition by the antibodies, employing polyclonal anti-human plasma Fn antibodies, AP-conjugated anti-rabbit IgG (Promega Corp.), 9.7% diethanolamine, pH 9.8 (Sigma Aldrich), Mg SO₄ (1mM) (Merck Igoda S.A) and p-nitrophenol (1mM). The method was modified as follows: the human plasma Fn was diluted in PBS in order to use duplicates in a 10 to 250 ng/ml range to obtain concentrations from 1/2 (w/v) to 1/4, 1/10 and 1/24 (v/v). The samples were placed on plates (Nunc MaxiSorp) and incubated for 12 hours at 4°C with the respective antibodies. They were then washed with fibronectin-free BSA (25). The absorbency was measured at 405 nm after 40 minutes in an ELISA reader (Novapath BIORAD Laboratories S.A).

The percentage protein loss was determined for the different conditions, taking the immediate determination as 100%. The average values and 95% levels of confidence were calculated for each storage group. All the data were compared by analysis of variance and Duncan's test was used for pairwise comparison.

RESULTS

A standard curve for the human plasma Fn was calculated from the average of the three assays per concentration, using the ELISA protocol described above. As can be seen in figure 1, the concentrations from 10 to 100 ng/ml show a linear response with a Spearman regression coefficient of 0.88.

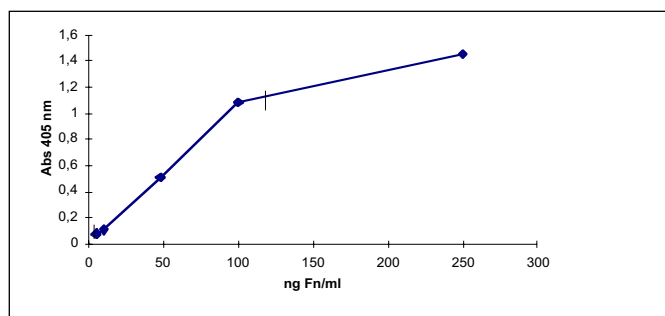


Fig. 1. Standard curve for the different concentrations assayed. Standard curve for human plasma Fn concentrations between 10 and 250 ng/ml. Each point represents the average value of the measurements from three different assays. (n=9) (r = 0.88).

The protein values were quantified for each of the 20 samples and each of the conservation methods (N=120). A 10% loss was observed in the samples kept in glass tubes for 24 hours at 4°C and the loss was greater if the samples were kept in plastic tubes. For the frozen samples, despite being stored in glass tubes, the protein loss figures lay in a range of 40% to 60%, as may be observed in figure 2.

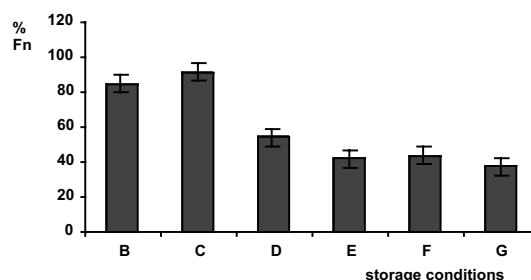


Fig. 2. Percentage protein loss according to conservation conditions. Percentage Fn loss for each of the storage conditions, taking immediate quantification as 100%.
 B: Samples kept for 24 hours at 4°C in plastic tubes
 C: Samples kept for 24 hours at 4°C in glass tubes
 D, E, F, G: Samples kept at -40°C in glass tubes for 1, 2, 4 and 8 weeks respectively

Table 1 shows the average values and 95% confidence intervals for each set of storage conditions. No significant differences were found between the protein levels measured immediately after collection and those obtained after being stored in a glass tube for 24 hours at 4°C. Statistically significant differences were found between these two and all the other groups.

	Average Fn in mg/ml	95% CI
Immediate quantification	127.41+	66.50 – 188.32
Stored for 24 hours at 4°C in plastic tubes	114.03 +	2.75 – 225.30
Stored for 24 hours at 4°C in glass tubes	123.54 *	64.85 – 182.23
Frozen for 1 week	72.74 +*	44.05 – 101.43
Frozen for 2 weeks	56.09 + *	31.06 – 81.12
Frozen for 4 weeks	58.16 + *	31.67 – 84.66
Frozen for 8 weeks	50.32 + *	26.69 – 74.35

Table 1. Average values and confidential intervals for each of the conservation methods.

+, * Groups where statistically significant differences were found

DISCUSSION AND CONCLUSIONS

The results obtained showed high losses of immune-reactive immunoreactive Fn in saliva when stored by the usual conservation freezing and storage methods. Although this has been demonstrated for samples of different body fluids by other authors (26), the high percentage of losses in saliva is a fact that should be considered with a view to careful handling of the samples.

Simply keeping the samples in plastic or handling the saliva with plastic instruments favours protein loss, as the protein coats on the tube walls. Conservation for 24 hours in a glass tube at 4°C causes minor losses but any of the other storage methods investigated causes very high losses.

Storage at -40°C and subsequent thawing causes very high

losses. These are probably related more to the thawing process than to the freezing of the samples in itself. It is also possible that the presence of protein degradation factors in the total saliva (27) and the well-known lability of the protein in the presence of water (28) result in the antibodies used for the assay being unable to recognise it. The protein's considerable capacity for binding to the cells and the extracellular matrix may be a factor in high losses during the thawing process.

One important fact is that the rabbit antibody allows binding to six fractions of the protein (230, 200, 110, 85, 75 and 65 KDa), as well as to the complete protein, whereas mouse monoclonal anti-serum only recognises the 230 KDa molecule, which is not present in the total saliva (29). This aspect is extremely important in relation to the protein quantification methodology, as it would not be possible to detect the protein with mouse monoclonal anti-serum.

In conclusion, saliva sample collection to quantify Fn should be performed with glass tubes, the samples should be processed no later than 24 hours after collection and during this time they should be stored at 4°C. Freezing and thawing the samples causes losses of up to 60% of the initial values of the protein.

BIBLIOGRAFIA/REFERENCES

- Ruoslahti E. Fibronectin and its receptor. *Ann Rev Biochem* 1988;57:375-431.
- Tynelius-Bratthall G, Ericson D, Araujo HM. Fibronectin in saliva and gingival crevices. *J Periodontol Res* 1986;21:563-8.
- Llena MC, Cornudella R, Barrau F, Gutiérrez M, Martínez MR, Tres A. Fibronectina y hepatopatías: un nuevo parámetro en la valoración de la función hepatocelular. *Rev Esp Enf Ap Digest* 1986;70:169-71.
- Atance JC, Tres A, Martínez MA, Ortells JL, Llena-Puy MC. Fibronectina: estudio en gastroenteritis agudas. *Re Esp En Ap Digest* 1987;72:512-4.
- Mosher DF. Physiology of fibronectin. *Ann Rev Med* 1984;35:561-75.
- Ruoslahti E, Vaheri A. Interaction of soluble fibroblast surface (fs) antigen with fibrinogen and fibrin. Identity with cold insoluble globulin of human plasma. *J Exp Med* 1982;141:497-501.
- Vanden-Abbeele A, Courtois P, Pourtois M. The antiseptic role of saliva. *Rev Belg Med Dent* 1992;47:52-8.
- Babu JP, Simpson WA, Courtney HS, Beachey E H. Interaction of human plasma fibronectin with cariogenic and non-cariogenic oral streptococci. *Infect Immun* 1983;41:162-8.
- Ericson D, Tynelius-Bratthall G. Absorption of fibronectin from human saliva by strains of oral streptococci. *Scand J Dent Res* 1986;95:377-9.
- Sojar HT, Lee JY, Genco RJ. Fibronectin binding domain of *P. Gingivalis* fimbriae. *Biochem Biophys Res Commun* 1995;216:785-92.
- Naito Y, Tohda H, Okuda K, Takazoe I. Adherence and hydrophobicity of invasive and noninvasive strains of *Porphyromonas Gingivalis*. *Oral Microbiology Immunol* 1993;8:195-202.
- Loo CY, Wilcox MD, Knox KW. Surface-associated properties of Actinomyces strains and their potential relation to pathogenesis. *Oral Microbiol Immunol* 1994;9:12-8.
- Tajima K, Yu S, Tmaki N, Ueda H, Hori Y, Kanehisa J, et al. The mechanisms dental plaque and dental calculus formation by fibronectin. IV. Demonstration of fibronectin in dental calculus. *J Jap Ass Periodontol* 1984;26:701-9.
- Tynelius-Bratthall G. Crevicular and salivary fibronectin before and after gingivitis treatment. *J Clin Periodontol* 1988;15:283-7.
- Babu JP, Dabbous MK. Interaction of salivary fibronectin with oral streptococci. *J Dent Res* 1986;65:1094-9.
- Babu JP, Dean JW, Pabst MJ. Attachment of *Fusobacterium nucleatum* to fibronectin immobilized on gingival epithelial cells or glass coverlips. *J Periodontol* 1995;66:285-90.
- Murkami Y, Hanazawa S, Tanaka S, Iwahashi H, Kitano S, Fujisawa S. Fibronectin in saliva inhibits *Porphyromonas Gingivalis* fimbria-induced expression of inflammatory cytokine gene in mouse macrophages. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1998;22:257-62.
- Llena MC, Motañana C, Forner L. Fibronectin levels in stimulated whole-saliva and their relationship with cariogenic oral bacteria. *Int Dent J* 2000;50:57-9.
- Sugano N, Tanaka H, Ito K, Murai S. Arg-Gly-Asp (RGD) peptides inhibit *Streptococcus mitis* to adherence to fibronectin. *J Nihon Univ Sch Dent* 1997;39:154-5.
- Su H, Boackle RJ. Interaction of the envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus with C1q and fibronectin under conditions present in human saliva. *Mol Immunol* 1991;28:811-7.
- Boackle RJ, Connor MH, Vasely J. High molecular weight non-immunoglobulin salivary agglutinins (NIA) bind C1Q globular heads and have the potential to activate the first complement component. *Mol Immunol* 1993;30:309-19.
- Tipton DA, Braxton SD, Dabbous MK. Role of salivary components as modulators of bleaching agent toxicity to human gingival fibroblasts in vitro. *J Periodontol* 1995;66:766-74.
- Zhan F, Wang H, Wang Z. Fibronectin in tissues and saliva of patients with oral lichen planus. *Zhonghuan Kou Qiang Yi Xue Za Zhi* 1996;31:235-7.
- Lyons AJ, Cui N. Salivary oncofetal fibronectin and oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*. 2000; 29: 267-70.
- Gómez-Lechón MJ, Castell JV. Measurement of fibronectin in human body fluids. *J Clin Chem Clin Biochem* 1986; 24:333-9.
- Lamberts BL, Pederson ED, Bial JJ, Tombasco PK. Fibronectin levels of unstimulated saliva from naval recruits with and without chronic inflammatory periodontal disease. *J Clin Periodontol* 1989;16:342-6.
- Gibbons RJ, Etherden I. Fibronectin-degrading enzymes in saliva and their relation to oral cleanliness. *J Periodontol Res* 1986;21:386-95.
- Gómez-Lechón MJ, Castell JV. Enzyme-linked immunosorbent assay to quantify fibronectin. *Anal Biochem* 1985;145:1-8.
- Kanehisa J, Doi S, Yamanaka T, Takeuchi H. Salivary fibronectin in man: an immunoblotting, radioimmunoassay and immunohistochemical study. *Arch Oral Biol* 1991;36:265-72.