UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

TAISA RIBAS DELECRODE

**Determinação da mudança na composição da película adquirida
formada sobre esmalte e dentina após exposição ácida: estudo
proteômico**

BAURU
2013

TAISA RIBAS DELECRODE

Determinação da mudança na composição da película adquirida formada sobre esmalte e dentina após exposição ácida: estudo proteômico

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências no Programa de Ciências Odontológicas Aplicadas, na área de concentração Estomatologia e Biologia oral.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Marília Afonso Rabelo Buzalaf

Versão Corrigida

BAURU
2013

D377d Delecrode, Taisa Ribas
Determinação da mudança na composição da
película adquirida formada sobre esmalte e dentina
após exposição ácida: estudo proteômico / Taisa
Ribas Delecrode. – Bauru, 2013.
118 p. : il. ; 31cm.

Dissertação (Mestrado) – Faculdade de
Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo

Orientador: Prof^a. Dr^a. Marília Afonso Rabelo
Buzalaf

Nota: A versão original desta dissertação encontra-se disponível no Serviço de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Odontologia de Bauru – FOB/USP.

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a
reprodução total ou parcial desta dissertação/tese, por processos
fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura:

Data:

Comitê de Ética da FOB-USP
Protocolo nº: 037/2011
Data: 25/05/2011

FOLHA DE APROVAÇÃO

DEDICATÓRIA

À Deus, por ter me dado forças nos momentos difíceis, coragem nos momentos de insegurança, sempre iluminado e guiado meus caminhos.

À minha mãe (Marli) e aos meus irmãos (Camila e Leandro), por sempre acreditar em mim e dar apoio incondicional em todos os momentos, mesmo durante os inúmeros desafios que surgiram no decorrer do mestrado. Aprendi com vocês que não é preciso prejudicar ninguém para alcançar os nossos objetivos. Agradeço por fazerem parte sempre da minha vida. Amo vocês! Mais uma vez muito obrigado!

Ao meu pai Orlando (*in memorium*), que mesmo observando as minhas dificuldades acadêmicas, sempre me mostrou que eu era capaz e não mediu esforços para me mostrar a importância de continuar estudando sempre. Com certeza, carrego comigo ótimos momentos, lembranças, conversas, puxões de orelha, conselhos, enfim, tudo o que eu sou hoje devo a ele. Obrigado pela lição de vida que deu, mesmo quando estava doente. Saudades eternas!

AGRADECIMENTOS

À orientadora Prof^a. Dr^a. Marília Afonso Rabelo Buzalaf, pela oportunidade, confiança e paciência depositada em mim para a realização deste trabalho. Aprendi não só admirá-la como uma excelente profissional, mas também como uma pessoa incrível (um verdadeiro coração materno, que sempre tem espaço para mais um). Acredito que você foi uma pessoa que Deus colocou no meu caminho para contribuir significativamente com o meu crescimento pessoal e profissional. Obrigada por tudo!

Ao co-orientador Prof. Dr. Walter Luiz Siqueira, pela oportunidade e pelo carinho com que fui recebida em seu laboratório. Obrigada por me ensinar a olhar este mundo acadêmico de outra forma e me mostrar que fazer pesquisa pode ser muito prazeroso.

À amiga Mel Bellini, por cada minuto que dividimos, seja este no trabalho ou no lazer. Obrigado pela paciência, cumplicidade e amizade demonstrada fora do laboratório e durante as horas intermináveis de experimento.

À amiga Flávia Zaidan, confesso que quando conheci a achei “sonhadora”, porém com a convivência vejo que ela é uma pessoa que luta pelo seus objetivos. Aprendi muito convivendo com você todo este tempo e fico muito feliz em ver você trilhar novos rumos na sua vida.

As amigas Flávia Zaidan e Mel Bellini, por me incentivarem a aceitar o desafio de fazer estágio no exterior. Realmente vocês tinham razão! Foi uma experiência fantástica, sendo muito bom conviver com vocês todo este tempo. Obrigado pelas conversas, risadas, discussões, baladinhas, experimentos, coletas e acidentes inesperados no gelo. Quantas coisas maravilhosas passamos juntos! Obrigada pela amizade e por dividir momentos especiais comigo.

Aos funcionários do Departamento de Ciências Biológicas, Aline, Larissa, Thelma, Vera, Dalva e o ex-funcionário Ovídio, pela atenção e pelo esforço dispensados durante as dúvidas e dificuldades da pesquisa.

À Yizhi Xiao (Cindy), funcionária do Siqueira Lab, pela forma paciente e carinhosa que sempre me ensinou, mesmo quando era necessário repetir várias vezes devido à dificuldade em me comunicar em inglês. Muito Obrigada!

A toda minha família que sempre me apoiaram e me incentivaram. Obrigada pela torcida.

Aos voluntários que participaram desta pesquisa: Melina Bellini, Aline Leite, Mileni Fernandes, Priscila Muno, Kellen Gasque, Janete Gualiume, Juliana Gadelha e Aline Dionizio. Se não fosse a paciência e dedicação de vocês, este trabalho não teria acontecido.

Aos Dentistas que me ajudaram na profilaxia e moldagem: Angela Bolanho, Senda Charone, Flávia Levy e Clarissa Fonseca. Obrigada por estarem sempre prontos a me ajudar e principalmente me ensinar um pouco desta profissão.

Aos colegas do Laboratório de Bioquímica pela companhia e amizade durante todo este tempo: conversas, risadas e auxílio no trabalho. Não irei citar nomes, para não correr o risco de esquecer alguém, mas tenham certeza que, de alguma forma, todos foram importantes.

Aos amigos da biologia, Mariana Trevisanuto, Marcela Pfeifer, Daiana Tavares, Laís Martineli, Fred Fregolente, Aline Cardoso, Aline Francisco e Samantha Pereira, que mesmo seguidos caminhos diferentes sempre estiveram presentes em minha vida.

Aos meus amigos: Livia Maria, Carlos Eduardo (Du), Fábio (FES), Mi Fernandes, Gabi Sander, Rodrigo Ddeus e Mariana Baccini, por todos os momentos que dividimos, desde os momentos difíceis e preocupações até as risadas, conversas e festas. Muito obrigado por me apoiarem e, acima de tudo, entenderem minha ausência.

As amigas, Clarissa Fonseca, Priscila Muno e Letícia Daré pela amizade construída durante este tempo de mestrado.

Aos professores da disciplina de Bioquímica da Faculdade de Odontologia de Bauru, Prof^a. Dr^a. Ana Carolina Magalhães e Prof. Dr. Rodrigo Cardoso de Oliveira, pela convivência e ensinamentos.

As professoras que participaram da qualificação: Prof^a. Dr^a. Camila Buzalaf e Prof^a. Dr^a. Daniela Rios, pelas dicas, sugestões e ensinamentos.

Aos colegas que fiz em London-CA: Marco Aurélio, Willian Custódio, Letícia Cristofolletti, Alina Reid, Meltem Bakkal, Elisa Berwanger e Lucio Barreto. Vocês foram de extrema importância na minha caminhada. Jamais esquecerei este quatro meses que vivi no Canadá e pelas amizades que fiz.

À Faculdade de Odontologia de Bauru, por me proporcionar toda a estrutura necessária para o desenvolvimento desta pesquisa.

À *University of Western Ontario – Canada*, pelo intercâmbio proporcionado e pela disponibilização de seus equipamentos laboratoriais para a realização de parte da análise deste trabalho.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo apoio financeiro concedido durante a realização deste estudo de Mestrado e estágio realizado no Canadá.

Enfim, a todos que colaboraram direta ou indiretamente para a concretização deste trabalho!

*“Permaneçei firmes e adiante. Nunca, jamais desanimeis, embora
venham ventos contrários.”*

Madre Paulina

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi analisar as mudanças no perfil protéico em películas adquiridas formadas *in situ*, em diferentes tempos, sobre o esmalte e sobre a dentina humana após a exposição a dois tipos de ácido: lático e cítrico. Foram utilizados 162 blocos de esmalte e 162 blocos de dentina humana (3X3 mm). Os experimentos foram realizados em três dias consecutivos. Em cada dia, os voluntários (n=9) utilizavam um dispositivo mandibular contendo 6 blocos de esmalte e 6 blocos de dentina. Na sequência, os voluntários permaneceram com o dispositivo na cavidade bucal por 10 ou 120 minutos para formação de película adquirida. Os blocos foram então imersos em ácido cítrico (1%, pH 2,5) ou ácido lático (0,1 M pH 4,8) ou água deionizada por 20 segundos. Na sequência, a película foi removida com um papel de filtro umedecido em ácido cítrico a 3%. Este procedimento foi repetido por mais dois dias adicionais e foi confeccionado um “pool” com os papéis de filtro obtidos dos 9 voluntários, para cada tipo de substrato, tempo de coleta e meio de imersão. Após extração das proteínas, as mesmas foram submetidas à cromatografia líquida de fase reversa interligada a um espectrômetro de massas (nLC-ESI-MS/MS). Os dados obtidos de MS/MS foram processados e submetidos conjuntamente ao programa SEQUEST [Proteome Discoverer 1.3 (Thermo Scientific)]. As buscas foram feitas utilizando-se os bancos de dados SWISS-PROT e TrEMBL. Para o esmalte, a taxa de identificação de proteínas foi baixa (13 proteínas no total). Já para a dentina, a taxa de identificação de proteínas foi maior (223 proteínas no total), sendo que a exposição ao ácido cítrico reduziu dramaticamente o número de proteínas identificado, o que não aconteceu para o ácido lático. Proteínas ácido-resistentes foram identificadas tanto para o esmalte quanto para a dentina, destacando-se as queratinas e as mucinas, respectivamente. Estas proteínas, ou os peptídeos oriundos delas responsáveis pelo efeito protetor, são candidatas a serem utilizadas para o enriquecimento de produtos odontológicos, visando à prevenção da cárie e erosão dentária.

Palavras-chaves: Película adquirida. Esmalte. Dentina. Cárie dentária. Erosão dentária. Análise proteômica.

ABSTRACT

Determination of change in the composition of the acquired pellicle formed on enamel and dentin after acid exposure: proteomic study

The purpose of this work was to analyze changes in protein profile in the acquired pellicle formed on enamel and dentine at different times in situ after exposure to lactic and citric acids. Enamel (n=162) and dentin (n=162) blocks (3X3 mm) were be used. The experiments were conducted on three consecutive days. Each day, volunteers (n = 9) used a mandibular device containing 6 blocks of enamel and 6 of human dentin. After the volunteers remained with the device in the oral cavity for 10 or 120 minutes in order to allow the formation of the acquired pellicle, the blocks were immersed in citric acid (1%, pH 2.5) or lactic acid (0.1 M, pH 4,8) or deionized water for 20 seconds. Following, the pellicle was collected with an electrode filter paper soaked in 3% citric acid. This procedure was repeated for two additional days and 'pools' with the filter papers obtained from the 9 volunteers for each type of substrate, sampling time and type of acid were made. After extraction, proteins were subjected to reverse phase liquid chromatography coupled to mass spectrometry (nLC-ESI-MS/MS). MS/MS data were processed and submitted to SEQUEST software [Proteome Discoverer 1.3 (Thermo Scientific)]. Searches were done using SWISS-PROT and TrEMBL databases. The rate of protein identification was low for enamel (13 proteins in total). As for dentin, the rte of protein identification was higher (223 proteins in total). Exposure to citric acid dramatically reduced the number of identified proteins, what did not occur for lactic acid. Acid-resistant proteins, especially keratins and mucins were identified for enamel and dentin, respectively. These proteins, or the peptides originated from them that are responsible for the protective effect, are candidates to be used for the enrichment of dental products, aiming to prevent dental caries and erosion.

Key words: Acquired pellicle. Enamel. Dentin. Caries. Dental erosion. Proteomic analysis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURAS

- Figura 1 - Sequência de eventos para a confecção dos blocos de dentes.46
- Figura 2 - Confecção da moldeira de silicone e colocação dos corpos de prova na mesma.....47
- Figura 3 - Cromatograma base-pico da película adquirida formada *in situ* sobre blocos de esmalte humana submetidas a tratamento com: A) ácido cítrico (10 minutos de formação); B) ácido cítrico (2 horas de formação); C) ácido láctico (10 minutos de formação); D) ácido láctico (2 horas de formação); E) água deionizada (10 minutos de formação); F) água deionizada (2 horas de formação). A separação de peptídeos foi sucedida utilizando coluna de cromatografia líquida de fase reversa com nano fluxo, e gradiente de eluição variando de 0 a 100% de solvente B em 85 minutos.....58
- Figura 4 - Cromatograma base-pico da película adquirida formada *in situ* sobre blocos de dentina humana submetidas a tratamento com: A) ácido cítrico (10 minutos de formação); B) ácido cítrico (2 horas de formação); C) ácido láctico (10 minutos de formação); D) ácido láctico (2 horas de formação); E) água deionizada (10 minutos de formação); F) água deionizada (2 horas de formação). A separação de peptídeos foi sucedida utilizando coluna de cromatografia líquida de fase reversa com nano fluxo, e gradiente de eluição variando de 0 a 100% de solvente B em 85 minutos.....59
- Figura 5 - Distribuição do número de proteínas identificadas a partir da película adquirida formada sobre o esmalte em diferentes tempos, e submetida a diferentes meios de imersão após a sua formação.....60
-
-

Figura 6	- Distribuição do número de proteínas identificadas a partir da película adquirida formada sobre a dentina em diferentes tempos, e submetida a diferentes meios de imersão após sua formação	60
Figura 7	- Diagrama de Venn mostrando a relação do número de proteínas identificadas em cada grupo e suas interações.....	77
Figura 8	- Distribuição funcional das proteínas identificadas na película adquirida formada sobre a dentina, baseado em Rison et al. (2000)	92
Figura 9	- Distribuição funcional das proteínas identificadas na película adquirida formada sobre a dentina, baseado em Rison et al. (2000)	93
Figura 10	- Distribuição da origem das proteínas identificadas na película adquirida formada sobre o esmalte.....	93
Figura 11	- Distribuição da origem das proteínas identificadas na película adquirida formada sobre a dentina.	94
Figura 12	- Distribuição das interações das proteínas identificadas na película adquirida formada sobre o esmalte.....	95
Figura 13	- Distribuição das interações das proteínas identificadas na película adquirida formada sobre a dentina.	96

- QUADRO

Quadro 1	- Concentração proteica média (µg/mL) utilizando o micro BCA nas amostras de película adquirida (papel ou líquido) coletadas do esmalte ou dentina, em diferentes tempos da formação (10 minutos e 2 horas), após exposição a diferentes tipos de ácidos	57
----------	--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	- Proteínas identificadas a partir da película adquirida formada <i>in situ</i> sobre o esmalte no tempo de 10 minutos, após exposição à água deionizada por 20 segundos.....	61
Tabela 2	- Proteínas identificadas a partir da película adquirida formada <i>in situ</i> sobre o esmalte no tempo de 2 horas, após exposição à água deionizada por 20 segundos.	61
Tabela 3	- Proteínas identificadas a partir da película adquirida formada <i>in situ</i> sobre o esmalte no tempo de 10 minutos, após exposição ao ácido cítrico 1% pH 2,5 por 20 segundos.....	61
Tabela 4	- Proteínas identificadas a partir da película adquirida formada <i>in situ</i> sobre o esmalte no tempo de 2 horas, após exposição ao ácido cítrico 1% pH 2,5 por 20 segundos.....	62
Tabela 5	- Proteínas identificadas a partir da película adquirida formada <i>in situ</i> sobre o esmalte no tempo de 10 minutos, após exposição ao ácido láctico 0,1 M pH 4,8 por 20 segundos.	62
Tabela 6	- Proteínas identificadas a partir da película adquirida formada <i>in situ</i> sobre o esmalte no tempo de 2 horas, após exposição ao ácido láctico 0,1 M pH 4,8 por 20 segundos.....	62
Tabela 7	- Proteínas identificadas a partir da película adquirida formada <i>in situ</i> sobre a dentina no tempo de 10 minutos, após exposição à água deionizada por 20 segundos.....	64
Tabela 8	- Proteínas identificadas a partir da película adquirida formada <i>in situ</i> sobre a dentina no tempo de 2 horas, após exposição à água deionizada por 20 segundos.	66
Tabela 9	- Proteínas identificadas a partir da película adquirida formada <i>in situ</i> sobre a dentina no tempo de 10 minutos, após exposição ao ácido cítrico 1% pH 2,5 por 20 segundos.....	68

Tabela 10 - Proteínas identificadas a partir da película adquirida formada <i>in situ</i> sobre a dentina no tempo de 2 horas, após exposição ao ácido cítrico 1% pH 2,5 por 20 segundos.....	68
Tabela 11 - Proteínas identificadas a partir da película adquirida formada <i>in situ</i> sobre a dentina no tempo de 10 minutos, após exposição ao ácido láctico 0,1 M pH 4,8 por 20 segundos.	69
Tabela 12 - Proteínas identificadas a partir da película adquirida formada <i>in situ</i> sobre a dentina no tempo de 2 horas após exposição ao ácido láctico 0,1 M pH 4,8 por 20 segundos.....	71
Tabela 13 - Proteínas presentes exclusivamente a partir da película adquirida formada <i>in situ</i> sobre o esmalte.....	78
Tabela 14 - Proteínas presentes exclusivamente a partir da película adquirida formada <i>in situ</i> sobre a dentina.	78
Tabela 15 - Classificação das proteínas identificadas a partir da película adquirida formada <i>in situ</i> sobre o esmalte por 10 minutos ou 2 horas, seguido por tratamento com ácido cítrico 1% pH 2,5, ácido láctico 0,1 M pH 4,8 ou água deionizada por 20 segundos.	84
Tabela 16 - Classificação das proteínas identificadas a partir da película adquirida formada <i>in situ</i> sobre a dentina por 10 minutos ou 2 horas, seguido por tratamento com ácido cítrico 1% pH 2,5, ácido láctico 0,1 M pH 4,8 ou água deionizada por 20 segundos.	85
Tabela 17 - Liberação de cálcio (mg/L por mm ²) a partir de blocos de esmalte cobertos por película adquirida formada por 10 minutos ou 2 horas, após exposição a água, ácido cítrico 1%, ácido láctico 0,1 M por 20 segundos.	99
Tabela 18 - Liberação de cálcio (mg/L por mm ²) a partir de blocos de dentina cobertos por película adquirida formada por 10 minutos ou 2 horas, após exposição a água, ácido cítrico 1%, ácido láctico 0,1 M por 20 segundos.	99

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

%	Porcentagem
±	Mais ou menos
Å	Ångström
BCA	Ácido Bicinconínico
Ca	Cálcio
CID	Dissociação induzida por colisão (<i>collision-induced dissociation</i>)
cm	Centímetros
CSP-1	<i>Common salivary protein 1</i>
Cu ⁺	Cobre
Cu ⁺²	Cobre
DMBT1	<i>Deleted in malignant brain tumor 1</i>
DP	Desvio padrão
DTT	Ditiotreitol
F	Nível de variância
Fe ⁺³	Ferro
g	Força centrífuga medida pela gravidade terrestre
h	Horas
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta <i>Performance</i> (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
kDa	Kilodalton (<i>Kilodalton</i>)

Kv	Quilovolts (<i>kilovolts</i>)
L	Litro
M	Molar
m/z	Razão entre massa e carga
mg	Miligramas
MG1	Mucina de alto peso molecular
MG2	Mucina de baixo peso molecular
min	Minutos
mL	Mililitros
mM	Milimolar
mm	Milímetros
mm ²	Milímetros ao quadrado
mm ³	Milímetros ao cubo
MS	Espectrometria de massa
MS/MS	Espectrometria de Massa Tandem (<i>Tandem mass spectrometry</i>)
MUC19	Mucina isoforma 19
MUC5B	Mucina oligomérica
n	Número
NH ₄ HCO ₃	Bicarbonato de amônia
nL	Nanolitro
	Nano cromatografia líquida com ionização por eletrospray e espectrometria de massas sequencial (<i>Nano liquid Chromatography Electrospray Ionization tandem Mass Spectrometry</i>)
nLc-ESI-MS/MS	
nm	Nanômetro
nº	Número

°C	Grau Celsius
P	Nível de significância
pH	Potencial hidrogeniônico
PH	<i>Plesckstrin homology</i>
pI	Ponto isoelétrico
PM	Peso molecular
PRP / PRPs	Proteína rica em prolina(s)
rpm	Rotação por minuto
slgA	Imunoglobulina A secretora
w/w	Peso/ peso (<i>weight/weight</i>)
α	Alfa
mg	Microgramas
μL	Microlitros
μm	Micrometros

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1	PELÍCULA ADQUIRIDA	21
2.1.1	Conceito e formação da película	21
2.1.2	Composição da película adquirida.....	23
2.1.3	Função protetora da película contra desafios erosivos	28
2.1.4	Função protetora da película contra desafios cariogênicos.....	32
3	PROPOSIÇÃO	39
4	MATERIAL E MÉTODOS	43
4.1	Obtenção dos dentes e preparo das amostras.....	45
4.2	Seleção das amostras	46
4.3	Seleção dos voluntários	46
4.4	Confecção da moldeira.....	47
4.5	Formação e coleta da película adquirida.....	47
4.6	Preparo das proteínas para análise proteômica.....	48
4.7	Espectrometria de Massas e identificação das proteínas.....	50
4.8	Análise dos espectros MS/MS.....	51
4.9	Análise dos meios de imersão.....	51
4.10	Análise estatística	52
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
6	CONCLUSÕES	101
	REFERÊNCIAS.....	105
	ANEXOS	115

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

A película adquirida é um filme orgânico, livre de bactérias, que cobre os tecidos dentários moles e duros. É composta de glicoproteínas e proteínas, incluindo várias enzimas, além de lipídeos (HANNIG, C.; HANNIG; ATTIN, 2005). Todas as superfícies sólidas expostas na cavidade bucal são cobertas por esta camada de natureza principalmente proteínácea (HANNIG, C.; HANNIG; ATTIN, 2005; HANNIG, M.; BALZ, 1999; HANNING; JOINER, 2006; LENDENMANN; GROGAN; OPPENHEIM, 2000). A adsorção de macromoléculas, em geral originárias da saliva, sobre o esmalte, é seletiva, isto é, certas macromoléculas mostram mais afinidade pela superfície mineral do que outras (NAUNTOFTE; TENOUVO; LAGERLÖF, 2007). Os constituintes da película derivam de diversas fontes, incluindo secreções glandulares, fluido gengival, células produzidas pelo epitélio bucal e produtos de microrganismos (FEATHERSTONE; BEHRMAN; BELL, 1993; HANNIG, M.; JOINER, 2006).

A principal função da película é constituir uma barreira protetora sobre o esmalte ou a dentina. Esta barreira protetora é o resultado de uma adsorção seletiva de proteínas salivares na superfície do dente (HANNIG, C.; HANNIG; ATTIN, 2005; LENDENMANN; GROGAN; OPPENHEIM, 2000; SKJORLAND; RYKKE; SONJU, 1995; SONJU; ROLLA, 1973). A película lubrifica as superfícies dentárias, o que reduz o atrito entre os dentes e a mucosa oral (evita o desgaste), forma uma barreira contra a erosão, serve como um reservatório de eletrólitos para a remineralização e apresenta várias propriedades antimicrobianas (AMAECHI et al., 1999; HANNIG, C.; HANNIG; ATTIN, 2005; HANNIG, M., 2002; HARA et al., 2006; JOINER et al., 2008; LENDENMANN; GROGAN; OPPENHEIM, 2000).

A película desempenha um importante papel modificador na cárie e erosão dentárias, devido à sua permeabilidade seletiva, que restringe o transporte de íons para dentro e para fora dos tecidos (MARSH; NYVAD, 2007). Em relação à erosão dentária, a película adquirida pode proteger por atuar como uma barreira de difusão ou membrana, prevenindo o contato direto entre os ácidos e a superfície dentária, desta maneira reduzindo a dissolução dos tecidos dentários duros (AMAECHI et al., 1999; HANNIG, M.; BALZ, 1999; HANNIG, M. et al., 2004; HANNIG, M.; JOINER,

2006; HARA et al., 2006). Em adição, a película é também uma base para que as bactérias possam aderir sobre a superfície dentária quando entram na cavidade bucal (LENANDER-LUMIKARI; LOIMARANTA, 2000), interferindo, desta maneira, na ocorrência de cárie dentária.

Devido à diferente composição entre o esmalte e a dentina, pode-se assumir que as propriedades de proteção da película contra a cárie e a erosão devem variar para estes dois tecidos dentários (HALL et al., 1999). Desta maneira, seria interessante avaliar a diferença na composição proteica da película formada sobre o esmalte e a dentina e, mais que isto, quais proteínas presentes nestas películas seriam mais resistentes à remoção por ácidos relacionados à cárie ou à erosão dentária. Este conhecimento pode auxiliar, no futuro, em procedimentos de “engenharia de película”, nos quais poder-se-ia enriquecer a película com as proteínas/peptídeos protetores, através da inserção dos mesmos em produtos odontológicos, como dentifrícios e soluções para bochecho. Desta forma, poder-se-ia prevenir a desmineralização e/ou favorecer a remineralização do esmalte ou da dentina.

2 Revisão de Literatura

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 PELÍCULA ADQUIRIDA

2.1.1 Conceito e formação da película

A película adquirida é um filme orgânico, livre de bactérias, que recobre os tecidos bucais moles e duros (HANNIG, C.; HANNIG; ATTIN, 2005; STIEFEL, 1976). Todas as superfícies sólidas expostas na cavidade bucal são cobertas por esta camada predominantemente proteinácea, mas contendo também glicoproteínas e lipídeos (HANNIG, C.; HANNIG; ATTIN, 2005; HANNIG, M.; JOINER, 2006; LENDENMANN; GROGAN; OPPENHEIM, 2000).

A morfologia da superfície da película adquirida é predominantemente globular. Forma-se pela adsorção de agregados de proteínas salivares, na forma de estruturas globulares ou micelas. Esta adsorção ocorre, em parte, através de interações eletrostáticas com os sítios de adsorção descobertos e ainda por interação hidrofóbica com a camada proteica inicial. Esta descrição pode explicar a morfologia da superfície globular da película adquirida (SKJORLAND; RYKKE; SONJU, 1995). Estas estruturas globulares representam agregados de proteína do tipo micela, que contribuem significativamente para o processo de formação da película e o rápido aumento da espessura da camada de película (HANNIG, M., 2002).

A primeira fase de formação da película é caracterizada pela adsorção quase instantânea de proteínas salivares na superfície do esmalte. Este processo de adsorção inicial começa em poucos segundos e, provavelmente, leva minutos para ser concluída. Isto é acompanhado por uma fase secundária, comparativamente mais lenta de adsorção de proteínas na superfície do dente revestida por proteínas (JONER et al., 2008; NAUNTOFTE; TENOUVO; LAGERLÖF, 2007). A espessura da película aumenta rapidamente dentro de 30 minutos, atingindo um patamar após 90 minutos (HANNIG, C.; HANNIG; ATTIN, 2005; JOINER et al., 2008; SKJORLAND; RYKKE; SONJU, 1995; SONJU; ROLLA, 1973). A espessura desta camada inicial

alcança em média 10–20 nm (HANNIG, M.; BALZ, 1999; HANNIG, M.; JOINER, 2006).

A espessura da camada de película é variável e depende do tempo de exposição bucal, bem como da localização no interior da cavidade bucal (AMAECHI et al., 1999; DEIMLING et al., 2007). Ele varia entre 10 e 20 nm, após 3 minutos e até 500 nm, em sítios vestibulares, após 2 horas (HANNIG, M., 1999; HANNIG, M.; JOINER, 2006; REICH et al., 2012). Tipicamente, a camada de película é caracterizada por uma camada basal elétron-densa (10-40 nm) e uma camada exterior disposta folgadamente, granular e globular (50-500 nm), cuja espessura depende do sítio de localização intrabucal (JOINER et al., 2008). Em geral, a película apresenta-se mais fina nas superfícies palatinas superiores e mais grossa nas superfícies linguais inferiores, pelo fato das superfícies linguais dos dentes inferiores estarem constantemente banhadas pela saliva das glândulas submandibular e sublingual (AMAECHI et al., 1999). Uma vez removida a película, a mesma começa a se formar imediatamente, ou seja, há a construção de uma nova barreira de proteção (HANNIG, M. et al., 2004).

Um estudo relatou que a película formada sobre os blocos de esmalte bovino sem ataque ácido mostrou uma fina camada basal homogênea, bem como uma estrutura granular. Esta camada elétron-densa apresentava uma espessura de 5-30 nm, sendo coberto com estruturas globulares de espessura e dimensões variáveis (20-500 nm), dependendo da sua localização. Porém, após um desafio ácido, observou-se redução considerável da película em todos os locais. Especialmente, as estruturas globulares foram removidas, mas a camada basal manteve-se intacta (HANNIG, C. et al., 2009).

Várias publicações consideram que a espessura da película atinge o equilíbrio entre a adsorção e dessorção e que a mesma está completamente formada dentro de 2 horas (LENDENMANN; GROGAN; OPPENHEIM, 2000; SKJORLAND; RYKKE; SONJU, 1995; SONJU; ROLLA, 1973). Este processo de maturação é necessário para transformar uma película recém-formada em uma película capaz de proteger os dentes contra a desmineralização (LENDENMANN; GROGAN; OPPENHEIM, 2000; STIEFEL, 1976).

A adsorção de macromoléculas, em geral originárias da saliva sobre o esmalte, é seletiva, isto é, certas macromoléculas mostram mais afinidade pela superfície mineral que outras (NAUNTOFTE; TENOUVO; LAGERLÖF, 2007). Na

faixa normal de pH bucal, os íons cálcio do esmalte têm uma tendência mais forte que os íons fosfato de se dissolver na saliva. A superfície do esmalte é carregada negativamente com os íons fosfato e será coberta com uma carga positiva carregada de íons cálcio, formando uma camada de hidratação, na qual as cargas são distribuídas irregularmente. Então, as proteínas salivares irão primeiramente ser adsorvidas à superfície do esmalte devido às interações eletrostáticas com a camada de hidratação por um lado, ocasionando a atração de macromoléculas de proteínas carregadas (HANNIG, M.; JOINER, 2006; NAUNTOFTE; TENOUVO; LAGERLÖF, 2007).

Proteínas salivares que exibem uma elevada afinidade por hidroxiapatita constituem as chamadas "proteínas precursoras da película" (LENDENMANN; GROGAN; OPPENHEIM, 2000). A adsorção contínua desses chamados precursores de película é de grande importância para o estabelecimento da funcionalidade biológica completa da película dentro de poucos minutos, como por exemplo, enzimas e moléculas protetoras que estão na camada externa da película (DEIMLING et al., 2007).

2.1.2 Composição da película adquirida

Na década de 70, foi demonstrado que não havia diferenças sistemáticas na composição principal da película formada em diferentes áreas da cavidade bucal (HANNIG, M.; JOINER, 2006). Porém, estudos recentes observaram diferenças nas composições da película entre as diferentes áreas da dentição, o que pode ser atribuído às ligeiras diferenças na disponibilidade de macromoléculas do meio ambiente bucal (CARLEN et al., 1998; SIQUEIRA; CUSTODIO; MCDONALD, 2012).

Os constituintes da película derivam de diversas fontes, incluindo secreções glandulares, fluido gengival, células produzidas pelo epitélio oral e produtos de microrganismos (FEATHERSTONE; BEHRMAN; BELL, 1993; HANNIG, M.; JOINER, 2006).

A localização no interior da cavidade bucal tem um impacto limitado na composição da película, apesar de ser observado que a espessura de películas *in situ* difere consideravelmente nos diferentes locais. Esta uniformidade de composição pode ser atribuída à adsorção de estruturas supramoleculares como micelas, durante a formação da película (DEIMLING et al., 2007). A saliva secretada

por diferentes glândulas salivares varia consideravelmente em termos de qualidade e quantidade (AMAECHI et al., 1999; CARLEN et al., 1998; HANNIG, M., 2002). A saliva da parótida é caracterizada por grandes quantidades de proteínas tipo amilase e proteínas ricas em prolina (PRP), ao passo que a saliva da sublingual contém altas concentrações de mucinas salivares (HANNIG, M., 2002).

Quase todas as proteínas salivares são glicoproteínas, isto é, contêm quantidades variáveis de carboidratos ligados ao seu núcleo proteico. Glicoproteínas são, em geral, classificadas de acordo com a célula que as origina e são, posteriormente, sub-classificadas baseadas nas suas propriedades biológicas (NAUNTOFTE; TENOUVO; LAGERLÖF, 2007).

As proteínas que contribuem para a película não estão bem definidas, porém a maioria das glicoproteínas identificadas na saliva são também encontradas na película. Macromoléculas como a α -amilase, lisozima, peroxidase, IgA, IgG e glucosiltransferase participam na formação da matriz da película junto com mucinas e produtos de degradação de macromoléculas da saliva e das bactérias (HANNIG, M., 2002). Assim, os componentes mais abundantes da película são as proteínas, glicoproteínas, enzimas e mucinas ou seus derivados (HANNIG, C.; HANNIG; ATTIN, 2005).

A película adquirida formada sobre a superfície do esmalte contém proteínas e glicoproteínas (por exemplo, fosfoproteínas, proteínas ricas em prolina (ácidas), histatinas esterinas, cistatina, albumina, α -amilase, lisozima, lactoferrina, anidrase carbônica, imunoglobulinas, mucina), bem como lipídios e glicolipídios, e componentes bacterianos, tais como glucosiltransferases (HANNIG, M., 2002).

Nos últimos anos, houve um grande avanço do conhecimento acerca das proteínas salivares, desde que técnicas proteômicas passaram a ser utilizadas para sua identificação (SIQUEIRA; CUSTODIO; MCDONALD, 2012).

Dentre as proteínas da película, a amilase é um dos precursores na formação da película inicial, além de possuir atividade enzimática (HANNIG, C. et al., 2005). Já as proteínas ricas em prolina (PRP), também precursores da película (HANNIG, C.; HANNIG; ATTIN, 2005) ajudam na lubrificação da superfície dos dentes (HAHNBERG; LINDH; ARNEBRANT, 2004; SIQUEIRA; CUSTODIO; MCDONALD, 2012), inibindo a deposição de cristal em superfícies de esmalte (SIQUEIRA; CUSTODIO; MCDONALD, 2012).

A lisozima é uma proteína ácida, que se liga especificamente a certas bactérias e pode facilitar a agregação bacteriana, bem como a aderência bacteriana (HANNIG, C.; HANNIG; ATTIN, 2005). Ela representa o principal componente antibacteriano inespecífico da camada proteica inicialmente adsorvida e é um componente estrutural essencial da película (HANNIG, C.; SPITZMULLER; HANNIG, 2009b; SIQUEIRA; CUSTODIO; MCDONALD, 2012; SIQUEIRA et al., 2007)

A fase orgânica da saliva contém agentes antimicrobianos, tais como a imunoglobulina A (IgA), lisozima, lactoferrina, e peroxidases que podem estar relacionadas com cárie (DEPAOLA, 2008; HARA; ZERO, 2010). O sistema de peroxidase salivar representa um dos principais mecanismos de defesa da cavidade bucal contra as doenças infecciosas. Em geral, as peroxidases removem H_2O_2 e outros peróxidos que provocam o *stress* oxidativo nos tecidos moles orais (HANNIG, C.; HANNIG; ATTIN, 2005).

Anidrases carbônicas I e II (LI et al., 2004; VACCA SMITH; BOWEN, 2000), além de anidrase carbônica VI, têm sido detectadas em películas formadas *in vivo* (LEINONEN et al., 1999). As anidrase carbônicas I e II foram detectados no período de formação de 30 minutos e 120 minutos nas camadas da película formada *in situ* e permaneceram biologicamente ativas na superfície da película, contribuindo para as suas propriedades protetoras (DEIMLING et al., 2007). A anidrase carbônica VI parece proteger os dentes contra cáries através de diferentes mecanismos de regulação de pH salivar e capacidade tampão (LEINONEN et al., 1999). Assim, esta família de enzimas salivares contribui indiretamente para proteger os tecidos dentais duros por tamponamento de ácidos bacterianos (DEIMLING et al., 2007; HANNIG, C. et al., 2007).

As mucinas têm um papel importante na lubrificação (SIQUEIRA; CUSTODIO; MCDONALD, 2012) e contribuem em grande parte para o efeito protetor da película adquirida contra a erosão do esmalte (BUZALAF; HANNAS; KATO, 2012; SIQUEIRA; CUSTODIO; MCDONALD, 2012). A mucina MG1 atua como precursor na formação da película inicial (HANNIG, C.; HANNIG; ATTIN, 2005; SCHUPBACH et al., 2001). Em particular, a mucina oligomérica (MUC5B) pode formar uma matriz muco aderente na superfície da mucosa bucal (PROCTOR et al., 2005).

Em um estudo *in situ*, o consumo de bebidas erosivas removeu quantidades consideráveis da camada exterior da película, mas a camada basal manteve-se inalterada. Considerou-se que a mucina (MUC5B) pode contribuir para a tenacidade

da camada basal. Com base nestas observações, a película não pode ser considerada como uma barreira fechada, mas sim como uma rede permeável de íons (HANNIG, C. et al., 2009). Além disso, as mucinas reduzem a solubilidade do esmalte, na qualidade de uma membrana seletiva permanente, não só regulando a difusão de íons de cálcio e de fosfato, mas também de agentes ácidos (FEATHERSTONE; BEHRMAN; BELL, 1993; HANNIG, M. et al., 2004; SLOMIANY et al., 1990; ZAHRADNIK; MORENO; BURKE, 1976).

Histatinas demonstraram proporcionar uma proteção contra a desmineralização *in vitro* (SIQUEIRA et al., 2010), além de apresentarem propriedades antimicrobianas e antifúngicas (HELMERHORST et al., 2006; SIQUEIRA; CUSTODIO; MCDONALD, 2012; SIQUEIRA et al., 2007). Apesar de todas as histatinas fornecerem algum nível de proteção contra o desafio ácido, histatinas fosforiladas proporcionam um nível maior de proteção do que as não fosforiladas (SIQUEIRA; CUSTODIO; MCDONALD, 2012). Estas proteínas sofrem uma rápida degradação proteolítica no interior da cavidade bucal (JENSEN; LAMKIN; OPPENHEIM, 1992; SIQUEIRA; CUSTODIO; MCDONALD, 2012).

A estaterina é a única proteína salivar que inibe tanto a precipitação de fosfato de cálcio primário (precipitação espontânea) quanto a precipitação de fosfato de cálcio secundária (crescimento de cristais) (LI et al., 2004). Esta inibição parece também contribuir para o caráter ácido protetor da película (SIQUEIRA; CUSTODIO; MCDONALD, 2012). A estaterina não é apenas um precursor da película (HANNIG, C.; HANNIG; ATTIN, 2005; LI et al., 2004), mas também um fator determinante da colonização microbiana inicial de superfícies dentárias (LI et al., 2004).

A cistatina possui funções antimicrobianas (SIQUEIRA; CUSTODIO; MCDONALD, 2012; SIQUEIRA et al., 2010; SIQUEIRA et al., 2007), além de ser um componente da película inicial basal, atuando como molécula precursora da película (HANNIG, C.; HANNIG; ATTIN, 2005). A presença de cistatinas em saliva total indica que elas são mais resistentes à degradação enzimática do que as estaterinas, histatinas e PRPs (JENSEN; LAMKIN; OPPENHEIM, 1992).

A atividade da transglutaminase está presente na superfície das células da mucosa bucal, sendo capaz de auxiliar na ligação cruzada com proteínas da película, tais como PRPs (ácidas), histatinas e cistatinas (HANNIG, C.; SPITZMULLER; HANNIG, 2009a; HANNIG, C. et al., 2008; YAO; LAMKIN; OPPENHEIM, 1999). Foi demonstrado que a transglutaminase está presente não só

em películas mucosas, mas também em películas do esmalte (HANNIG, C.; HANNIG; ATTIN, 2005; HANNIG, C.; SPITZMULLER; HANNIG, 2009a; HANNIG, C. et al., 2008). Isto oferece uma explicação para a resistência de películas formadas *in vivo* ou *in situ* devido à não ocorrência de alterações conformacionais observadas em componentes da película após a adsorção (BRADWAY et al., 1992; HANNIG, C.; HANNIG; ATTIN, 2005; HANNIG, C. et al., 2008; YAO; LAMKIN; OPPENHEIM, 1999).

Em contraste com processos proteolíticos, a ligação catalisada pela transglutaminase parece desempenhar um papel fundamental para a maturação intrínseca da película *in situ* (BRADWAY et al., 1992; HANNIG, C.; SPITZMULLER; HANNIG, 2009a; HANNIG, C. et al., 2008; YAO; LAMKIN; OPPENHEIM, 1999). Esta enzima pode transformar a película em uma forma mais resistente, quando liberada na cavidade bucal por células epiteliais bucais (BRADWAY et al., 1992; HANNIG, C. et al., 2008). Desta forma, a transglutaminase pode formar uma película orgânica mais resistente à erosão (LENDENMANN; GROGAN; OPPENHEIM, 2000).

As elastases são proteínas que constituem um terço das proteínas salivares, e são os principais componentes das estruturas globulares como micela e a película adquirida do esmalte (HANNIG, C. et al., 2008; SOARES et al., 2004).

O estudo de Hannig, C. et. al. (2009b) mostrou claramente que a aspartato aminotransferase, bem como a alanina aminotransferase, estão presentes na camada de película numa conformação ativa após 3 minutos. Isto assegura a função biológica constante da camada de película, independentemente do tempo de formação ou localização na cavidade bucal (HANNIG, C.; SPITZMULLER; HANNIG, 2009a). Aspartato aminotransferase e alanina aminotransferase são componentes integrais da película *in situ*. Eles podem contribuir para a maturação intrínseca da camada de película *in vivo* (HANNIG, C.; SPITZMULLER; HANNIG, 2009a). As fosfatases estão envolvidas em doenças periodontais (TOTAN et al., 2006) e a fosfatase alcalina podem desempenhar um papel no processo de remineralização (LEONT'EV et al., 1992), por modular as interações proteína-proteína durante a adsorção *de novo* de PRPs (HANNIG, C. et al., 2008).

2.1.3 Função protetora da película contra desafios erosivos

A principal função da película é constituir uma barreira protetora sobre o esmalte e a dentina. Esta barreira protetora é o resultado de uma adsorção seletiva de proteínas salivares na superfície do dente (HANNIG, C.; HANNIG; ATTIN, 2005; LENDENMANN; GROGAN; OPPENHEIM, 2000; SKJORLAND; RYKKE; SONJU, 1995; SONJU; ROLLA, 1973).

A película lubrifica as superfícies dentárias, o que reduz o atrito entre os dentes e a mucosa bucal (evita o desgaste), forma uma barreira de difusão, ou uma membrana de permeabilidade seletiva, que impede o contato direto entre os ácidos e a superfície do dente, reduzindo a desmineralização, serve como um reservatório de eletrólitos para a remineralização, e apresenta várias propriedades antimicrobianas (AMAECHI et al., 1999; HANNIG, C.; HANNIG; ATTIN, 2005; HANNIG, M., 2002; HANNIG, M.; BALZ, 1999; HARA et al., 2006; JOINER et al., 2008; LENDENMANN; GROGAN; OPPENHEIM, 2000). Além disso, a película pode atuar como uma membrana semipermeável (JOINER et al., 2008) e assim proporcionar uma função protetora contra a desmineralização após um desafio ácido (JOINER et al., 2008; LENDENMANN; GROGAN; OPPENHEIM, 2000; ZAHRADNIK; MORENO; BURKE, 1976).

A película adquirida tem a função de permeabilidade seletiva, regulando os processos des-resmineralização nas superfícies dentais. Devido a esta natureza, possui a capacidade para modificar a difusão dos ácidos e o transporte de íons cálcio/fosfato para dentro e para fora da superfície de esmalte, reduzindo a velocidade de dissolução da hidroxiapatita (HANNIG, C. et al., 2007; HANNIG, M., 2002; HANNIG, M. et al., 2004). A diminuição da capacidade de difusão do ácido láctico através da camada de película tem sido relacionada com os seus componentes lipídicos (HANNIG, M., 2002; HANNIG, M. et al., 2004).

A erosão dentária é definida como a perda irreversível de tecido dentário duro devido a processos químicos (dissolução ácida), sem o envolvimento de microrganismos (ATTIN et al., 2003; HANNIG, C. et al., 2009; HANNIG, C. et al., 2005; SCHLUETER et al., 2011). O esmalte e a dentina têm composição distinta, sendo afetados pela erosão de forma diferente (HANNIG, C. et al., 2007; SCHLUETER et al., 2011). O esmalte é constituído principalmente por hidroxiapatita, que é moderadamente solúvel em pH ácido (HEMINGWAY et al., 2010). Já a

dentina contém mais matéria orgânica, e mostra maior perda mineral quando submetida a desafios erosivos (SCHLUETER et al., 2011). O ataque de ácido conduz a um amolecimento e desmineralização da superfície do dente, assim, a superfície do dente está mais susceptível à abrasão e ao desgaste (ATTIN et al., 2003). Substâncias ácidas representam o principal fator etiológico, podendo estes ácidos serem de origem intrínseca ou extrínseca (AMAECHI et al., 1999; HANNIG, C. et al., 2007; HANNIG, C. et al., 2005).

Causas extrínsecas da erosão dentária envolvem alimentos e bebidas ácidos como frutas, sucos de frutas, refrigerantes ou bebidas esportivas (AMAECHI et al., 1999; HANNIG, C. et al., 2009; HANNIG, M. et al., 2004). O principal fator intrínseco é o suco gástrico que entra em contato com a dentição, especialmente em pacientes que sofrem de anorexia nervosa, bulimia ou regurgitações crônicas (AMAECHI et al., 1999; HANNIG, C. et al., 2007; HANNIG, C. et al., 2009; HANNIG, C. et al., 2005).

Após o contato com ácido, a superfície dos dentes fica amolecida, e quando o pH da saliva retorna à neutralidade estas superfícies amolecidas podem se remineralizar. A manifestação clínica da erosão pode ser o resultado de ataque ácido mais frequente, em que a capacidade remineralizante de saliva é ultrapassada (AMAECHI; HIGHAM, 2001).

O impacto de bebidas erosivas é influenciado principalmente pelo pH, mas também pela capacidade tampão e, em menor extensão, pela concentração de ácido não dissociado (ATTIN et al., 2003; HANNIG, C. et al., 2007; HANNIG, C. et al., 2009; LARSEN; NYVAD, 1999). Vários mecanismos fisiológicos têm propriedades antierosivas, tais como sistemas tampão salivares e a película adquirida (HANNIG, C. et al., 2007). A presença de concentrações adequadas de cálcio, fosfato e fluoreto adicionados à bebida pode ajudar a reduzir a dissolução, mas seu impacto é limitado (LARSEN; NYVAD, 1999).

O contato frequente da língua nas superfícies palatinas dos dentes tende a reduzir a espessura da película e, portanto, o seu efeito protetor, tornando assim estas superfícies mais propensas à erosão. O tempo de maturação da película e os tipos de saliva (parótida, submandibular, sublingual) também têm sido relatados por influenciar o efeito de proteção da película contra a desmineralização dos dentes (AMAECHI et al., 1999). Além disso, a película mais madura é capaz de reduzir a difusão de íons e proteger o esmalte dos dentes contra a desmineralização. O aumento do tempo da formação da película de duas horas resulta em um maior

potencial para proteger contra a desmineralização (AMAECHI et al., 1999; HANNIG, M., 2002; HANNIG, M. et al., 2004), mas a formação em um curto tempo também inibe significativamente a desmineralização (HANNIG, M., 2002; HANNIG, M. et al., 2004). Estes resultados indicam que os processos de maturação de longa duração, aparentemente, não aumentam o potencial de proteção *in vivo* da camada de película formada (HANNIG, M., 2002). No entanto, a formação da película inicial não pode inibir completamente o processo erosivo, mas tem potencial para reduzir a erosão (HANNIG, M. et al., 2004; HARA et al., 2006).

A formação da película na superfície da dentina é de grande relevância clínica, devido à susceptibilidade das margens cervicais livres ou descobertas. Em geral, a dentina é mais suscetível à desmineralização erosiva do que o esmalte (HANNIG, C. et al., 2007). Isto ocorre pelo fato de a dentina ser um material mais macio e facilmente removido pelo processo de desgaste do dente (HANNIG, C. et al., 2007; JOINER et al., 2008). Mas há ainda poucos trabalhos na literatura que relatam o potencial protetor da película adquirida formada sobre a dentina.

No trabalho de Hara et. al. (2006), a falta de proteção encontrada para a película da dentina pode estar relacionada com a maior porosidade e solubilidade da dentina em comparação com o esmalte. Assim, a dentina pode ser desmineralizada relativamente mais rápido do que o esmalte, não permitindo que a película atue como uma barreira protetora contra o desafio erosivo (HANNIG, C. et al., 2007; HARA et al., 2006). Em outro trabalho, foi demonstrado que as propriedades protetoras da película adquirida contra um desafio erosivo da superfície da dentina são limitadas (HANNIG, C. et al., 2009).

A camada de película formada *in situ* reduz e retarda a desmineralização do esmalte durante a exposição ao ácido, mas não inibe completamente a desmineralização, o que também ocorre para a dentina (HANNIG, C. et al., 2007; HANNIG, M., 2002; HANNIG, M. et al., 2004). Esta redução da desmineralização pode ser devida ao fato de a película atuar como um reservatório de retenção de íons de cálcio e fosfato, liberados durante o processo de erosão (HANNIG, C. et al., 2007; HANNIG, M., 2002).

Uma vez que diferentes ácidos variam na sua capacidade de desmineralizarem o esmalte bovino (HANNIG, C. et al., 2005), a proteção da película formada *in situ* na erosão do esmalte e da dentina causada pelos ácidos hidrolórico, cítrico e fosfórico foi analisada (WIEGAND et al., 2008). Espécimes de

esmalte e dentina bovinos foram expostos por 120 minutos na cavidade bucal de 10 voluntários saudáveis. Na sequência, os espécimes de esmalte e dentina cobertos pela película foram imersos extraoralmente em 1 mL de ácido hidrolórico, cítrico ou fosfórico (pH 2,6, 60 segundos, n=30 para cada ácido). Espécimes sem película (n=10) serviram como controle. A liberação de cálcio no ácido foi determinada por espectrometria de absorção atômica. Os espécimes recobertos pela película tiveram perda de cálcio significativamente reduzida quando comparados àqueles sem película, para todos os tipos de ácidos. A proteção média ($\pm$ DP) conferida pela película (porcentagem de redução de perda de cálcio) foi significativamente melhor para o esmalte ($60,9 \pm 5,3$) que para a dentina ($30,5 \pm 5,0$), mas não houve diferença entre os tipos de ácidos. Achados semelhantes foram obtidos em outros estudos. Foi observada uma redução na perda de cálcio entre 60 e 78% para amostras de esmalte erodidas por ácidos cítrico a 1% por 60 segundos (HANNIG, M. et al., 2004; HANNIG, M. et al., 2003). A proteção média (30,5%) obtida para a dentina combinando os resultados dos 3 diferentes tipos de ácidos (WIEGAND et al., 2008) está de acordo com resultado de um estudo prévio (HANNIG, C. et al., 2007), que encontrou uma redução da perda de cálcio da ordem de 27% após o tratamento com ácido hidrolórico (pH 2,3, 5 minutos). Outro estudo in vitro também mostrou que a película ofereceu proteção significativamente maior para o esmalte (44%) que para a dentina (14%) (WETTON et al., 2006).

O estudo de Wiegand et al. (2008) permitiu uma comparação direta dos efeitos da película na proteção contra a erosão do esmalte e da dentina. Pode-se assumir que diferenças na estrutura do esmalte e da dentina poderiam afetar a composição da película adquirida (GLANTZ; BAIER; CHRISTERSSON, 1996) e, desta maneira, o seu potencial protetor, que é atribuído à sua habilidade em agir como uma barreira de difusão ou uma membrana semipermeável (HANNIG, M. et al., 2003). A maior porosidade e solubilidade da dentina comparada ao esmalte leva a uma desmineralização mais rápida, o que pode impedir que a película aja como uma barreira protetora (HARA et al., 2006). Tem-se ainda especulado que a saliva penetra nos túbulos dentinários produzindo não apenas uma camada de película sobre a superfície, mas um menisco de líquido viscoso nos orifícios tubulares (WETTON et al., 2006).

2.1.4 Função protetora da película contra desafios cariogênicos

A cárie dentária é uma doença crônica e, portanto, um processo que progride de forma muito lenta, na maioria dos indivíduos e, na ausência de tratamento, progride até destruir totalmente a estrutura dentária. A doença pode afetar o esmalte, a dentina e o cemento radicular. A destruição localizada dos tecidos duros, geralmente denominada “lesão”, é o sinal da doença (FEJERSKOV; NYVAD; KIDD, 2007).

A lesão de cárie é definida como dissolução química dos tecidos dentários duros por ácidos bacterianos, produtos da degradação de açúcares com peso molecular baixo. Em contraste, a erosão é definida como a dissolução do mineral da apatita causada por ácidos de qualquer outra origem, exceto os ácidos usados para o condicionamento de esmalte e dentina, com a finalidade de retenção de materiais resinosos (NAUNTOFTE; TENOUVO; LAGERLÖF, 2007). O ácido láctico é produto metabólico final de muitas bactérias, geralmente associado com a cárie (HANNIG, C. et al., 2005; SLOMIANY et al., 1986).

As bactérias do biofilme produzem uma variedade de produtos finais que podem ser diferentes, dependendo da dieta. Quando os carboidratos fermentáveis estão presentes, os principais ácidos orgânicos produzidos são ácidos láctico, fórmico e acético (HARA; ZERO, 2010; LENANDER-LUMIKARI; LOIMARANTA, 2000). No entanto, o complexo e dinâmico ambiente criado pela interação entre biofilme, saliva, película adquirida, dieta e tecido rígido em si devem ser levados em conta para compreender o processo de cárie (HARA; ZERO, 2010).

A saliva é um importante fator de proteção para a cárie dentária. Quando o fluxo salivar é diminuído ou perdido completamente, existe um aumento significativo na degradação de todas as superfícies expostas dos dentes, o que é muito evidente em pacientes com hipossalivação (FEATHERSTONE; BEHRMAN; BELL, 1993). O fluxo salivar é o fator mais importante na proteção da boca humana e da dentição contra doenças infecciosas. Isso não acontece apenas porque o fluxo efetivamente remove microrganismos exógenos e endógenos e seus produtos metabólicos, mas também porque um suprimento estável de saliva garante a presença contínua de fatores imunológicos e não imunológicos na boca (NAUNTOFTE; TENOUVO; LAGERLÖF, 2007).

O cálcio salivar pode ser encontrado nas formas iônica ou ligada, dependendo do pH da saliva. O cálcio livre ionizado é especialmente importante para os eventos que ocorrem no desafio cariogênico, pois essa é a fração do cálcio que participa do estabelecimento do equilíbrio entre os fosfatos de cálcio do tecido dentário duro e seu líquido adjacente (NAUNTOFTE; TENOUVO; LAGERLÖF, 2007).

A capacidade da película em retardar o aparecimento de lesões de cárie parece depender, pelo menos em parte, por causa dos seus componentes lipídicos. A remoção dos lipídeos da película resultou no aumento da difusão de ácido láctico e a sua reassociação restaurou a capacidade de retardamento da cárie ocasionada pela película. Assim, os lipídeos da película não só controlaram a extensão da desmineralização do esmalte pelos ácidos cariogênicos, mas também modularam a invasão das superfícies dos dentes por bactérias (SLOMIANY et al., 1986).

Os lipídios salivares, bem como os lipídeos presentes na película adquirida são importantes para a prevenção da cárie (FEATHERSTONE; BEHRMAN; BELL, 1993). A maioria dos lipídeos, em todas secreções salivares, está associada a proteínas. Tem-se assumido que lipídeos ligados a mucinas podem modificar a adesão bacteriana à superfície dentária e prevenir a difusão de ácidos bacterianos na película adquirida (NAUNTOFTE; TENOUVO; LAGERLÖF, 2007). Lipídeos contribuem significativamente para a capacidade da película em retardar a difusão de ácidos produzidos por microrganismos cariogênicos e, portanto, podem desempenhar um papel no controle do grau de desmineralização do esmalte (SLOMIANY et al., 1990; SLOMIANY et al., 1986). Lipídios na película dificultam a adesão bacteriana e protegem a superfície do dente contra desafios erosivos (REICH et al., 2012).

A película pode proteger contra a cárie de pelo menos duas maneiras: primeiro, pode afetar a fixação e a posterior colonização de microrganismos cariogênicos e, em segundo lugar, pode afetar o transporte de ácidos (metabolicamente produzido por bactérias) para as superfícies dos dentes e o transporte dos constituintes iônicos dissolvidos da superfície do mineral para o meio ambiente salivar (ZAHRADNIK; MORENO; BURKE, 1976). A película desempenha um importante papel modificador na cárie e erosão dentárias devido à sua permeabilidade seletiva, que restringe o transporte de íons para dentro e para fora dos tecidos (MARSH; NYVAD, 2007).

A colonização microbiana dos dentes requer a aderência bacteriana às suas superfícies. Os mecanismos envolvidos na aderência são muitos complexos e ainda não totalmente entendidos. Inicialmente, acreditava-se que as bactérias eram associadas de forma inespecífica às superfícies dentárias, sob a influência das forças de van der Waals, que são forças eletrostáticas atrativas e repulsivas. Um alto grau de hidrofobia pode facilitar a aderência. Uma aderência firme pode subsequentemente ser alcançada através de mecanismos específicos entre as moléculas da superfície da célula microbiana e da película

A película é também uma base para que as bactérias possam aderir quando entram na cavidade oral. A ligação da bactéria é mediada por interações eletrostáticas não específicas e forças de van der Waals, mas também (MARSH; NYVAD, 2007).por interações específicas entre as bactérias e as proteínas da película (LENANDER-LUMIKARI; LOIMARANTA, 2000).

Muitas bactérias possuem componentes proteicos chamados adesinas nas suas superfícies, que se ligam de uma forma específica estereoquimicamente às moléculas complementares, ou receptores, na superfície do tecido. Adesinas são geralmente lectinas que se ligam aos receptores de sacarídeos, mas algumas adesinas provavelmente se ligam aos receptores proteicos. Estudos de componentes da saliva humana que se adsorvem à hidroxiapatita (semelhantes às superfícies dos dentes) e promovem a fixação de biofilme bacteriano, revelaram que as PRPs ácidas promovem a ligação de várias bactérias importantes, como *Actinomyces viscosus*, *Bacteroides gingivalis*, algumas cepas de *Streptococcus mutans*, dentre outras (GIBBONS, 1989).

A estaterina mostrou-se menos eficaz do que qualquer uma das PRPs para promover a adesão de *Actinomyces viscosus* LY7, sendo esta diferença significativa. As PRPs ácidas e a estaterina funcionam como os principais receptores salivares na promoção da adesão de *Actinomyces viscosus* em superfícies de apatita semelhantes às dos dentes (GIBBONS; HAY, 1988), o que também ocorre na adesão de *Streptococcus gordonii* (GIBBONS; HAY; SCHLESINGER, 1991). Neste processo, estaterina e PRPs parecem ter funções ativas na ancoragem de receptores, o que permite que os microrganismos se prendam firmemente às suas superfícies por interações eletrostática, iônicas, hidrofóbicas e forças de van der Waals (HARA; ZERO, 2010).

Os principais fatores de defesa bucais inatos são os sistemas de peroxidase, lisozima, lactoferrina e histatinas. *In vitro*, estas proteínas são conhecidas por limitar o crescimento de bactérias ou fungos, interferir com a absorção de glicose bacteriana ou o metabolismo de glicose e promover a agregação e, portanto, a eliminação de bactérias (LENANDER-LUMIKARI; LOIMARANTA, 2000). As imunoglobulinas [IgG, IgM, IgA e IgA secretora (slgA)], formam a base da defesa salivar específica contra a microbiota bucal, incluindo *Streptococcus mutans* (LENANDER-LUMIKARI; LOIMARANTA, 2000).

Utilizando abordagens de espectrometria de massa, uma forte correlação entre a presença de fosfoproteínas (PRP1, PRP3, histatina1 e estaterina) e a ausência de cárie foi encontrada em um estudo, o que sugere que as grandes quantidades de fosfoproteínas podem contribuir para os processos mais eficazes de remineralização (HARA; ZERO, 2010; VITORINO et al., 2005). Por isso, os eventos que afetam a interação de fosfolípidos salivares com os componentes de mucina da película podem ser um fator determinante na resistência das superfícies dos dentes à desmineralização por ácidos produzidos por microrganismos cariogênicos (SLOMIANY et al., 1990). Certas funções salivares, tais como a aglutinação e promoção ou inibição de adesão bacteriana, podem ser estimadas pela atividade de várias proteínas salivares (NAUNTOFTE; TENOUVO; LAGERLÖF, 2007).

Atribui-se a algumas macromoléculas salivares um papel especial na homeostasia do cálcio bucal. Tais moléculas são a estaterina, a histidina e as PRPs, que se ligam ao cálcio em alto grau e também inibem a precipitação do fosfato de cálcio. Em adição, o cálcio tem alta capacidade de ligação à amilase, atuando como um cofator necessário para a função da enzima (NAUNTOFTE; TENOUVO; LAGERLÖF, 2007).

As mucinas são hidrofílicas e retêm muita água, resistindo à desidratação e, portanto, sendo efetivas na lubrificação e manutenção da superfície da mucosa úmida. Além disso, mucinas apreendem algumas bactérias, facilitando a sua deglutição. Alguns oligossacarídeos das mucinas mimetizam aqueles das células da superfície da mucosa e assim, competitivamente, inibem a adesão de células bacterianas aos tecidos moles pelo bloqueio de grupos reativos, as adesinas, que estão nas superfícies das células bacterianas. Dentre as mucinas, a forma de baixo peso molecular, MG2, é mais eficiente na aglutinação bacteriana e limpeza que a MG1 (NAUNTOFTE; TENOUVO; LAGERLÖF, 2007). Com efeito, a MG1 predomina

na saliva de indivíduos susceptíveis à cárie, enquanto que o nível de MG2 parece ser consistentemente mais elevado na saliva de indivíduos resistentes à cárie (LENANDER-LUMIKARI; LOIMARANTA, 2000).

O papel biológico da amilase é hidrolisar o amido em maltose, maltotriose e dextrinas. A maltose pode também ser fermentada por bactérias bucais e, ainda, a hidrólise da maltotriose produz glicose como um produto final. A amilase salivar elimina da boca resíduos alimentares que contenham amido, mas são formados ácidos neste processo. Dessa forma, o amido tem algum potencial cariogênico. A amilase salivar também interage especialmente com certas espécies de bactérias bucais, e pode desempenhar ainda um papel desconhecido na modulação da adesão bacteriana às superfícies orais (NAUNTOFTE; TENOUVO; LAGERLÖF, 2007).

A lisozima salivar está presente em recém-nascidos em níveis iguais àqueles encontrados em adultos e pode, assim, exercer funções antimicrobianas antes da erupção dentária. Adicionalmente, a lisozima, como uma proteína fortemente catiônica, pode ativar autolisinas bacterianas, o que pode destruir as paredes celulares (NAUNTOFTE; TENOUVO; LAGERLÖF, 2007).

A lactoferrina é uma glicoproteína ligante do ferro secretada pelas células serosas das glândulas salivares maiores e menores. Os leucócitos são também ricos em lactoferrina e liberam essa proteína no fluido gengival e na saliva integral. A função biológica da lactoferrina é atribuída à sua alta afinidade com o ferro (Fe^{+3}) e à consequente expropriação desse metal essencial para microrganismos patogênicos. Isto leva a um efeito bacteriostático, que é perdido se a molécula de lactoferrina estiver saturada com ferro (NAUNTOFTE; TENOUVO; LAGERLÖF, 2007).

Os sistemas peroxidase da saliva têm duas principais funções biológicas: atividade antimicrobiana e proteção das proteínas e células do hospedeiro contra a toxicidade do H_2O_2 . Dependendo do pH (mais efetivo em pH baixo) e da concentração de hipotiocianato, os sistemas peroxidase são efetivos contra vários microrganismos, tais como *Streptococcus mutans*, lactobacilos, fungos, muitos anaeróbicos (patógenos periodontais) e mesmo alguns vírus (herpesvírus tipo 1, vírus da imunodeficiência humana) (NAUNTOFTE; TENOUVO; LAGERLÖF, 2007).

A anidrase carbônica VI é um produto de secreção das glândulas salivares e é encontrada na película adquirida. Um estudo recente revelou que a colonização bucal por *Streptococcus mutans* e o desenvolvimento de cárie é reduzido em

animais *knockout* para a expressão de anidrase carbônica VI na saliva. Foi sugerido que a anidrase carbônica VI pode promover cárie por modular a microbiota bucal, favorecendo a colonização por *Streptococcus mutans* e/ou a produção enzimática de ácidos no biofilme (CULP et al., 2011).

Um estudo recente identificou as proteínas derivadas do hospedeiro que mais interagem com *Streptococcus mutans* (linhagem UA159). Observou-se que duas proteínas abundantes no hospedeiro [*common salivary protein-1* (CSP-1) e *deleted in malignant brain tumor 1* (DMBT1, também conhecida como aglutinina salivar ou gp340)] se ligam fortemente a *Streptococcus mutans*. A CSP-1 recombinante não causou agregação de *Streptococcus mutans* e não apresentou atividade biocida em concentrações variando de 2,5 a 10 µg/mL. Entretanto, os *Streptococcus mutans* expostos à CSP-1 recombinante (10 µg/mL) mostraram aderência aumentada à película adquirida, bem como aos glucanos da película formada sobre superfícies de hidroxiapatita, sugerindo que a CSP-1 se liga a *Streptococcus mutans* e pode influenciar na colonização inicial desta bactéria patogênica sobre a superfície dentária (AMBATIPUDI et al., 2010).

As cistatinas parecem ser muito abundantes, estando presentes em inúmeros fluidos corporais e tecidos, e são geralmente consideradas protetoras, pois inibem proteólises indesejadas. As cistatinas na saliva e na película adquirida podem inibir determinadas proteases bacterianas e também proteases originadas da lise de leucócitos (NAUNTOFTE; TENOUVO; LAGERLÖF, 2007).

Diante do exposto, nota-se que várias proteínas presentes na película adquirida parecem ter potencial para interferir na ocorrência de cárie e erosão dentária. O estudo destas proteínas, e, principalmente, a informação de quais delas podem têm uma ácido-resistência maior, ou seja, continuam aderidas à película mesmo após desafios erosivos ou cariogênicos, pode ser particularmente interessante para o desenvolvimento de novos produtos para Odontologia preventiva.

3 Proposição

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste trabalho foi analisar as mudanças no perfil proteico em películas adquiridas formadas *in situ*, em diferentes tempos, sobre o esmalte e sobre a dentina humana após a exposição a dois tipos de ácido: láctico e cítrico.

As hipóteses nulas testadas foram:

1. a exposição das películas formadas sobre o esmalte a desafios ácidos cariogênicos ou erosivos não altera o seu perfil proteico, independentemente do tempo de formação da película;
2. a exposição das películas formadas sobre a dentina a desafios ácidos cariogênicos ou erosivos não altera o seu perfil proteico, independentemente do tempo de formação da película.

4 Material e Métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Obtenção dos dentes e preparo das amostras

Para o presente estudo, foram utilizados dentes terceiros molares humanos recentemente extraídos, livres de cárie, sendo desinfetados em solução tamponada de timol 2% a 4 °C, em pH 7,0 por no mínimo 30 dias, e submetidos à análise visual, para a averiguação de possíveis manchas e trincas, situação na qual foram excluídos da amostra.

A limpeza dos dentes selecionados foi realizada removendo todo e qualquer resíduo de tecido gengival aderido à superfície com o auxílio de uma cureta periodontal (DUFLEX. Ind. Bras.), visando a preparar os dentes para o corte. Primeiramente, foram removidas as raízes com uma secção na porção cervical dos dentes, com o auxílio de um torno de polimento odontológico adaptado para corte (Fábrica Nacional de Motores Monofásicos Nevoni/ Série 16223, Tipo: TG1/3, São Paulo, SP) e um disco diamantado Diaflex-F (Wilcos do Brasil, Ind. e Com. Ltda., Petrópolis, RJ).

Na sequência, as coroas dos dentes foram fixadas com godiva (Kerr) em uma placa de acrílico (40x40x5 mm³). A placa foi parafusada em um aparelho de corte de precisão ISOMET Low Speed Saw (Buehler Ltd, USA) e com dois discos diamantados de dupla face - XL 12205, "High concentration", 102 x 0,3 x 12,7 mm³ (Extec Corp., Enfield, CT, USA/ Ref: 12205) e um espaçador de aço inoxidável (7 cm de diâmetro, 3 mm de espessura e orifício central de 1,3 cm) entre os discos, com velocidade de 300 rpm, refrigerado com água deionizada. Foram obtidos os blocos de esmalte de 3 x 3 mm através de uma secção dupla no sentido cérvico-incisal e outra no sentido mésio-distal.

Após o corte de todos os blocos de esmalte, prosseguiu-se com o preparo dos blocos de dentina radicular. Primeiramente, foram obtidas fatias da porção cervical da raiz com a utilização dos dois discos separados por um espaçador de aço inoxidável de 3 mm. Após a obtenção das fatias de dentina radicular, dois espécimes 3 x 3 mm foram obtidos através da secção no sentido vestibulo-lingual. Além disso, os blocos de dentes tiveram todas as suas superfícies protegidas com

esmalte de unhas, com exceção da superfície vestibular do esmalte e da dentina (Figura 1).

Figura 1. Sequência de eventos para a confecção dos blocos de dentes.

4.2 Seleção das amostras

Para o estudo, foram utilizados 162 corpos de prova confeccionados em esmalte humano e outros 162 corpos de prova confeccionados em dentina humana (3x3 mm). Estes corpos de prova foram divididos para cada tipo de meio de imersão, a saber: ácido cítrico (n= 54), ácido láctico (n=54) e água deionizada (n= 54).

4.3 Seleção dos voluntários

O projeto de pesquisa foi inicialmente submetido à avaliação do Comitê de Ética em pesquisa da FOB-USP, sendo aprovado sob nº 037/2011 (Anexo A).

Participaram deste estudo 9 voluntários, na faixa etária de 18 a 35 anos, do gênero feminino, que após explicação detalhada do objetivo da pesquisa, assinaram o Termo de Consentimento Livre Esclarecido (Anexo B).

Os critérios de exclusão para a composição da amostra foram: ser fumante, apresentar lesões de cárie, gengivite, periodontite, fluxo salivar baixo (não estimulado e estimulado devendo ser superior a 0,1 e 1,0 mL/minuto respectivamente) e estar fazendo uso de medicamentos que afetam o fluxo salivar.

Antes do início do experimento, foi coletada a saliva de cada voluntário seguindo padrões estabelecidos na literatura (WONG, D. T., 2008) para a aferição do fluxo salivar não estimulado e estimulado dos voluntários e o pH salivar. Para o

fluxo salivar não estimulado, obteve-se uma média de 0,5 mL/minuto e pH 6,9. Já para o fluxo salivar estimulado, obteve-se uma média de 1,5 mL/minuto e pH 7,4, estando os voluntários aptos para participarem da pesquisa.

4.4 Confeção da moldeira

Os voluntários tiveram seus arcos inferiores moldados em alginato para a confecção de um modelo de gesso pedra. Sobre este modelo foi confeccionada uma moldeira de silicone (moldeira de clareamento dentário). Foram colocados nesta moldeira os corpos de prova, com o auxílio de lâminas de cera (figura 2).

Estes blocos foram divididos na moldeira de clareamento dentário de forma aleatória para a formação da película adquirida *in situ*, sobre blocos de esmalte e dentina humanos. Em cada dispositivo e em cada dia de experimento foram fixados, na face vestibular, 6 blocos de esmalte e 6 de dentina.

Figura 2. Confeção da moldeira de silicone e colocação dos corpos de prova na mesma.

4.5 Formação e coleta da película adquirida

O procedimento utilizado para a coleta da película adquirida *in situ*, ocorreu no período da manhã, para evitar os efeitos circadianos sobre a composição da película (ZIMMERMAN et al., 2013).

Em cada dia, o voluntário recebeu uma meticulosa profilaxia dentária com jato de bicarbonato de sódio, para que assim a película adquirida se formasse naturalmente sobre o esmalte e a dentina durante os períodos de 10 e 120 minutos. A coleta foi realizada em três dias consecutivos para cada tempo, meio de imersão e

substrato (esmalte e dentina). Durante este período, os voluntários foram privados do consumo de alimentos e bebidas.

Imediatamente após a profilaxia, os voluntários receberam seus dispositivos para início da coleta. Passados os 10 minutos, os blocos (n=3 para esmalte e n=3 para dentina) correspondentes a este tempo de tratamento foram removidos e imersos em 1 mL de ácido cítrico 1% (pH 2,5) (Merck KGaA, Damstadt, Alemanha) ou ácido láctico (0,1 M pH 4,8) (Synth, Diadema, São Paulo) ou água deionizada por 20 segundos (n=1 bloco para cada meio de imersão). Depois de decorrido este tempo, os blocos foram removidos da solução, lavados com água deionizada e secos com o auxílio de um jato de ar. A película adquirida formada sobre os blocos de esmalte e dentina foi coletada utilizando um papel filtro de eletrodos (*electrode wick filter paper*, Bio-Rad, Hercules, CA) de 5X10 mm pré-mergulhado em ácido cítrico 3% (Merck KGaA, Damstadt, Alemanha) contendo coquetel inibidor de proteases (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany; 10 µL de coquetel concentrado 25X para 990 µL de ácido cítrico 3%). O papel filtro foi mantido sobre os blocos com auxílio de uma pinça (SIQUEIRA et al., 2007). Decorrido o tempo de 2 horas, o mesmo procedimento foi realizado para a coleta da película adquirida correspondente a este tempo de formação. Os papéis contendo a película adquirida foram imediatamente armazenados sob refrigeração a -80°C, até serem transportadas dentro de criotubos, à temperatura ambiente, para o Siqueira Lab, Schulich School of Medicine & Dentistry, University of Western Ontario, Canadá. Ao chegarem no respectivo laboratório, foram mantidas a -80°C até a análise.

4.6 Preparo das proteínas para análise proteômica

Neste trabalho, utilizou a técnica de análise proteômica qualitativa do tipo *shotgun* livre de marcadores (*label-free*). Para a extração de proteínas, os papéis dos 9 voluntários foram picotados e agrupados para confecção do *pool* em um único microtubo, sendo apenas divididos pela exposição aos meios de imersão (ácido cítrico, ácido láctico ou água deionizada), tipo de substrato (esmalte ou dentina) e tempo de formação de película (10 minutos ou 120 minutos).

O preparo das amostras foi realizado no Siqueira Lab, Schulich School of Medicine & Dentistry, University of Western Ontario, Canadá, sob a supervisão do

colaborador Prof. Dr. Walter Luiz Siqueira. Para tal, adicionaram-se 400 µL da solução 1 (ureia 4 M + DTT 10 mM + NH_4HCO_3 50 mM, pH 7,8), sendo então feita incubação por 1 hora à temperatura ambiente. Decorrido este tempo, adicionaram-se 300 µL da solução 2 (50 mM NH_4HCO_3 , pH 7,8), sendo feita uma sonicação das amostras por 2 minutos. Esta solução foi retirada e colocada em outro microtubo. Para uma extração mais eficiente das proteínas que ainda estavam aderidas ao papel filtro, novamente foram adicionados 300 µL de solução 2 e foi conduzida outra sonicação por 2 minutos. De novo a solução foi retirada, adicionada ao mesmo microtubo onde se encontrava a primeira solução e aos papéis foram adicionados 300 µL de solução 2 e foi conduzida outra sonicação por 2 minutos. Desta forma, o volume final obtido foi de 1300 µL. Este volume final foi concentrado [reduzido o volume no *Speedvac* (Eppendorf, Parkway, NY, USA) para 600 µL] e iniciou-se a digestão triptica após a adição de tripsina 2% (w/w), que permaneceu sob incubação por 16 horas em banho-maria a 37°C. Os papéis restantes nos microtubos também foram utilizados para que não houvesse perda de amostra, já que a quantidade de proteína encontrada na película adquirida é baixa. Assim, aos mesmos foram adicionados 400 µL da solução 2 e foi feita digestão, após a adição de tripsina 2% (w/w), que permaneceu sob incubação por 16 horas em banho-maria a 37°C.

Após a incubação das amostras (papéis e líquido, separadamente) por 16 horas, estas foram centrifugadas a 14000 g durante 20 minutos e o sobrenadante foi extraído (para que fosse retirada uma quantidade maior de líquido e eliminadas as fibras dos papéis filtro). Uma alíquota das amostras (papéis e líquido, separadamente) foi transferida para um novo microtubo para a realização da quantificação proteica pelo método Micro BCA (Protein Assay Reagent Kit, Micro BCA, Pierce Biotechnology, Rockford, IL, EUA). Esta quantificação estimou a quantidade de amostra que seria necessária para a realização da cromatografia líquida e espectrometria. Previamente à quantificação, as amostras foram secas em *Speedvac* (Eppendorf, Parkway, NY, USA). Logo após a secagem destas amostras, foi realizada quantificação proteica usando o método Micro BCA (Protein Assay Reagent Kit, Micro BCA, PIERCE), que permite a detecção colorimétrica e a quantificação de proteína. Este método combina a redução de Cu^{+2} a Cu^+ por proteínas em meio alcalino (reação do biureto) com a detecção colorimétrica, muito sensível e seletiva, do íon Cu^+ , usando um reagente contendo ácido bicinconínico. Nesta reação forma-se um produto de cor roxa, solúvel em água, com forte

absorbância a 562 nm e linear com concentrações crescentes ao longo de uma gama extensa de concentrações de proteína. Para a realização da quantificação, as amostras foram ressuspensas em 300 µL de água deionizada, e a quantificação foi realizada em duplicata, seguindo as instruções do fabricante.

As amostras secas foram ressuspensas em 20 µL de solução de equilíbrio/lavagem (ácido trifluoroacético 0,1%) e foi então iniciado o procedimento conhecido como ZipTip®, que consiste na dessalinização (purificação) e concentração da amostra para melhoria nos dados a serem obtidos através da espectrometria de massa. Inicialmente, as ponteiros de ZipTip® C18 (Millipore Corporation, Billerica, MA, EUA) foram lavadas com em acetonitrila 100%, por 4 vezes, sendo a solução dispensada em cada lavagem. Foi também realizada nova lavagem com a solução de equilíbrio/lavagem (ácido trifluoroacético 0,1%) por 5 vezes (após cada lavagem a solução foi dispensada). Após a assepsia da ponteira, esta foi carregada com as amostras (aspirando e dispensando por 10 vezes), sendo na sequência realizada uma lavagem com a solução de equilíbrio/lavagem (ácido trifluoroacético 0,1%) por 10 vezes (aspirando e dispensando). Na última etapa, realizou-se a eluição das amostras com ácido trifluoroacético 0,1% + acetonitrila 80%, sendo os peptídeos eluídos por 10 vezes dentro do mesmo microtubo (aspirando e dispensando). Depois deste processo, realizou-se a secagem das amostras (*Speedvac*, Eppendorf, Parkway, NY, USA), que foram armazenadas a 4°C até a análise por espectrometria de massas (LTQ Velos, Thermo Scientific, Sao Jose, CA, EUA).

4.7 Espectrometria de Massas e identificação das proteínas

A separação dos peptídeos e as análises espectrométricas foram feitas utilizando o nano-HPLC Proxeon (Thermo Scientific, Sao Jose, CA, EUA), que permite cromatografia líquida *in-line* com a coluna capilar. Esta coluna era de 75 mm x 610 cm (Pico Tip™ EMITTER, New Objective, Woburn, MA) preenchida com resina C18 com poros de 5 µm de diâmetro e 200 Å (Michrom BioResources, Auburn, CA), acoplada ao espectrômetro de massas (LTQ Velos, Thermo Scientific, Sao Jose, CA, EUA), usando ionização por *eletrospray* em modo de busca, na faixa de valores m/z 390-2000 em tandem MS/MS.

Quantidades iguais de todas as amostras já secas foram ressuspensas em 20 µL de ácido fórmico 1% e então submetidas a nLC-ESI-MS/MS. O HPLC de fase reversa *nanoflow* foi desenvolvido com um gradiente linear de 85 minutos variando de 0 a 100% de solvente B (ácido fórmico 0,1% em acetonitrila), num fluxo de 200 nL/min, com pressão máxima de 280 bar. A voltagem e temperatura do capilar de transferência de íons foram 1,8 kV e 250°C, respectivamente. Cada espectro (MS) obtido foi seguido por seleção sequencial automatizada de sete peptídeos para CID, com exclusão dinâmica dos íons previamente selecionados.

Os espectros MS/MS obtidos foram confrontados com bases de dados de proteínas humanas (UniProt and TrEMBL, Swiss Institute of Bioinformatics, Geneva, Switzerland, <http://ca.expasy.org/sprot>) usando o algoritmo SEQUEST no *software* Proteome Discoverer 1.3 (Thermo Scientific, San Jose, CA, USA). Os resultados das buscas foram filtrados a uma taxa de Falsas Descobertas de 1%, utilizando uma estratégia de pesquisa de banco de dados inversa. Todas as análises foram realizadas em triplicata, ou seja, cada grupo deveriam ter espectros parecidos para serem considerados confiáveis.

4.8 Análise dos espectros MS/MS

Os dados obtidos de MS/MS foram processados e submetidos conjuntamente ao programa SEQUEST no *software* Proteome Discoverer 1.3 (Thermo Scientific, San Jose, CA, USA). As buscas foram feitas utilizando-se os bancos de dados SWISS-PROT e TrEMBL.

4.9 Análise dos meios de imersão

O possível efeito protetor das películas formadas sobre esmalte e dentina foi analisado através da quantificação do cálcio liberado nos meios de imersão, empregando-se um ensaio colorimétrico. Para tanto, foi utilizado o reagente arsenazo III (Bioclin, Quibasa Química Básica Ltda., Belo Horizonte, MG, Brasil), de acordo com as instruções do fabricante. O cálcio reage com o arsenazo III em meio

ácido, formando um complexo de coloração azul/roxo. A absorbância foi medida em comprimento de onda de 650 nm, utilizando-se o leitor de microplacas Fluostar Optima (BMG Labtech, Cary, NC, EUA). A intensidade da cor é proporcional à quantidade de cálcio presente na amostra.

Todas as análises foram feitas em duplicata, de modo que a concentração de cálcio para a amostra foi determinada pela média aritmética das leituras.

4.10 Análise estatística

Para análise das concentrações de cálcio liberadas em solução, os *softwares* GraphPad InStat (versão 3,0 para *Windows*, GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, EUA) e Prism (Versão 4,0 para *Windows*, GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, EUA) foram utilizados.

Os dados apresentaram distribuição normal (teste de Kolmogorov-Smirnov) e homogênea (teste de Bartlett), sendo então analisados pelo teste ANOVA a 2 critérios de medidas repetidas e teste de Bonferroni para comparações individuais. Para os blocos de esmalte, os dados foram transformados em logaritmo antes da aplicação da ANOVA. O nível de significância adotado foi de 5%.

5 Resultados e Discussão

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A quantificação proteica utilizando o método micro BCA resultou numa concentração média no esmalte de 11 $\mu\text{g/mL}$ de proteína para a amostra do papel e 37 $\mu\text{g/mL}$ de proteína para a amostra líquida. Para a dentina, os resultados correspondentes foram 13 $\mu\text{g/mL}$ e 40 $\mu\text{g/mL}$ de proteína, respectivamente para as amostras de papel e líquida. Os resultados demonstraram que, para detecção das proteínas das amostras, a utilização do líquido foi mais eficiente do que o papel (Quadro 1). A fim de se obter um melhor aproveitamento, os resultados finais obtidos através da espectrometria de massas foram agrupados, e estão assim apresentados.

O cromatograma base-pico para a cromatografia de fase reversa, monitorado pelo espectrômetro de massa representa a intensidade de todos os íons peptídicos da amostra em uma única análise após a digestão trípica para análise proteômica (Figuras 3 e 4). Para cada grupo foram realizadas três corridas, com duração de 85 minutos cada. Para o esmalte, os cromatogramas revelaram um padrão consistente de eluição de proteínas/peptídeos no intervalo de tempo de 20 a 50 minutos, para o tempo de 2 horas, enquanto que para o tempo de 10 minutos a eluição iniciou-se antes (aos 14 minutos). Em geral, mais picos foram observados para o tempo de 10 minutos, quando comparado ao de 2 horas, independente do tratamento. Já para a dentina, as diferenças observadas nos cromatogramas entre os 2 diferentes tempos de formação foram mais pronunciadas do que aquelas observadas para o esmalte, com uma quantidade de picos bem maior para o tempo de 10 minutos, quando comparado ao de 2 horas. A intensidade dos picos foi maior nos grupos tratados com água e ácido láctico, especialmente para o tempo de 2 horas de formação da película.

Os peptídeos encontrados foram identificados através de busca no banco de dados utilizando o algoritmo SEQUEST, seguindo os critérios descritos na seção materiais e métodos. A identificação de proteínas foi bem maior para a dentina (223 proteínas diferentes) do que para o esmalte (13 proteínas diferentes). Nas figuras 5 e 6 são apresentadas a distribuição das proteínas identificadas, de acordo com o substrato (esmalte ou dentina, respectivamente), tempo de formação (10 ou 120

minutos) e meio de imersão após a formação (ácido cítrico, ácido lático ou água deionizada).

Estudos prévios empregando a mesma estratégia proteômica identificaram um número de proteínas bem maior a partir da película adquirida formada sobre o esmalte *in vivo* (LEE *et al.*, 2013; SIQUEIRA *et al.*, 2010; SIQUEIRA; OPPENHEIM, 2009; SIQUEIRA *et al.*, 2007; ZIMMERMAN *et al.*, 2013) ou discos de hidroxiapatita (SIQUEIRA *et al.*, 2012). É possível que a redução no número de proteínas observada para o esmalte seja devido ao tipo de substrato sobre o qual a película adquirida foi formada (blocos de esmalte humano de 3X3 mm no presente estudo e não dentes naturais, o que pode ter reduzido a área sobre a qual a película foi formada). Em um estudo recente utilizando blocos de esmalte bovino os autores identificaram 56 proteínas diferentes, embora tenham colhido película formada *ex vivo* a partir de saliva humana e tenham empregado 40 dentes bovinos para a formação da película em cada grupo (MASSON *et al.*, 2013). Outra diferença em relação ao procedimento de coleta da película no presente estudo, quando comparado aos estudos realizados *in vivo* (LEE *et al.*, 2013; SIQUEIRA *et al.*, 2010; SIQUEIRA; OPPENHEIM, 2009; SIQUEIRA *et al.*, 2007; ZIMMERMAN *et al.*, 2013), foi o fato de que, no presente estudo, visando reduzir a proteólise das amostras, foi acrescentado um coquetel contendo inibidor de proteases (Complete, Roche Diagnostics) ao ácido cítrico a 3%, no qual os papéis para coleta de película foram imersos. É possível que este procedimento possa ter interferido nos resultados obtidos. Entretanto, o mesmo procedimento também foi realizado para as amostras de dentina e, neste caso, o número total de proteínas identificadas foi bem maior, totalizando 223. Não foi possível comparar o número total de proteínas identificadas a partir da película adquirida formada sobre a dentina com outros trabalhos da literatura, uma vez que o presente trabalho é pioneiro neste sentido, empregando análise proteômica.

As proteínas identificadas para o esmalte, nos tempos de formação de 10 minutos e 2 horas estão listadas nas Tabelas 1 e 2, respectivamente, após exposição da película à água deionizada. Observou-se que, no tempo de 10 minutos foram identificadas 4 proteínas, e no tempo de 2 horas, apenas 1 proteína. As listas de proteínas identificadas após exposição ao ácido cítrico, nos tempos de formação da película de 10 minutos e 2 horas, estão listadas nas Tabelas 3 e 4, respectivamente. Foram identificadas 9 e 8 proteínas, respectivamente. As Tabelas

5 e 6 mostram os mesmos dados, após exposição ao ácido láctico, sendo identificadas 6 e 1 proteína, respectivamente.

Ao analisar-se os dados, observa-se que, mesmo para o grupo tratado com água deionizada, a taxa de identificação foi muito baixa, notando-se ausência de proteínas classicamente descritas na película, como PRPs, cistatinas, estaterina, mucinas e alfa amilase (HAY et al., 1988; MORENO; VARUGHESE; HAY, 1979; OPPENHEIM et al., 1986; SIQUEIRA et al., 2007). Por este motivo, considerou-se que os resultados não foram satisfatórios, devendo o estudo ser repetido com outras estratégias, como, por exemplo, a não colocação de inibidores de proteases no ácido cítrico 3% para coleta de amostras, emprego de um maior número de blocos de esmalte humano para formação da película adquirida *in situ* ou ainda coleta de película adquirida *in vivo*, sendo que esta última estratégia, combinada à primeira. Devido à baixa identificação de proteínas encontradas para o esmalte, não se aterá, no presente estudo, à discussão destes dados.

Quadro 1. Concentração proteica média ($\mu\text{g/mL}$) utilizando o micro BCA nas amostras de película adquirida (papel ou líquido) coletadas do esmalte ou dentina, em diferentes tempos da formação (10 minutos e 2 horas), após exposição a diferentes tipos de ácidos.

	Esmalte ($\mu\text{g/mL}$)		Dentina ($\mu\text{g/mL}$)	
	Papel	Líquido	Papel	Líquido
Ácido cítrico 10 minutos	8	42	14	43
Ácido cítrico 2 horas	9	36	13	39
Ácido Láctico 10 minutos	17	38	12	44
Ácido Láctico 2 horas	11	35	15	40
Água deionizada 10 minutos	10	35	14	37
Água deionizada 2 horas	11	37	11	42

Figura 3. Cromatograma base-pico da película adquirida formada *in situ* sobre blocos de esmalte humana submetidas a tratamento com: A) ácido cítrico (10 minutos de formação); B) ácido cítrico (2 horas de formação); C) ácido láctico (10 minutos de formação); D) ácido láctico (2 horas de formação); E) água deionizada (10 minutos de formação); F) água deionizada (2 horas de formação). A separação de peptídeos foi sucedida utilizando coluna de cromatografia líquida de fase reversa com nano fluxo, e gradiente de eluição variando de 0 a 100% de solvente B em 85 minutos.

Figura 4. Cromatograma base-pico da película adquirida formada *in situ* sobre blocos de dentina humana submetidas a tratamento com: A) ácido cítrico (10 minutos de formação); B) ácido cítrico (2 horas de formação); C) ácido láctico (10 minutos de formação); D) ácido láctico (2 horas de formação); E) água deionizada (10 minutos de formação); F) água deionizada (2 horas de formação). A separação de peptídeos foi sucedida utilizando coluna de cromatografia líquida de fase reversa com nano fluxo, e gradiente de eluição variando de 0 a 100% de solvente B em 85 minutos.

Figura 5. Distribuição do número de proteínas identificadas a partir da película adquirida formada sobre o esmalte em diferentes tempos, e submetida a diferentes meios de imersão após a sua formação.

Figura 6. Distribuição do número de proteínas identificadas a partir da película adquirida formada sobre a dentina em diferentes tempos, e submetida a diferentes meios de imersão após sua formação.

Tabela 1. Proteínas identificadas a partir da película adquirida formada *in situ* sobre o esmalte no tempo de 10 minutos, após exposição à água deionizada por 20 segundos.

Nº de acesso	Nome da proteína	Score	Coverage	# AAs	PM (kDa)	pI
H6VRF8	Keratin 1	14,58	2,95	644	66,0	8,12
P35527	Keratin, type I cytoskeletal 9	63,83	15,25	623	62,0	5,24
P04264	Keratin, type II cytoskeletal 1	14,58	2,95	644	66,0	8,12
P35908	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal]	13,39	7,04	639	65,4	8,00

Tabela 2. Proteínas identificadas a partir da película adquirida formada *in situ* sobre o esmalte no tempo de 2 horas, após exposição à água deionizada por 20 segundos.

Nº de acesso	Nome da proteína	Score	Coverage	# AAs	PM (kDa)	pI
P35527	Keratin, type I cytoskeletal 9	38,90	13,16	623	62,0	5,24

Tabela 3. Proteínas identificadas a partir da película adquirida formada *in situ* sobre o esmalte no tempo de 10 minutos, após exposição ao ácido cítrico 1% pH 2,5 por 20 segundos.

Nº de acesso	Nome da proteína	Score	Coverage	# AAs	PM (kDa)	pI
Q8IUUK7	ALB protein	43,89	3,79	396	45,1	6,10
B4DRS2	cDNA FLJ58275, highly similar to Keratin, type II cytoskeletal 4	5,02	4,23	520	56,2	6,34
H6VRF8	Keratin 1	41,92	15,84	644	66,0	8,12
P13645	Keratin, type I cytoskeletal 10	7,70	3,60	584	58,8	5,21
P35527	Keratin, type I cytoskeletal 9	73,70	8,83	623	62,0	5,24
P04264	Keratin, type II cytoskeletal 1	41,92	15,84	644	66,0	8,12
P35908	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal	28,33	9,86	639	65,4	8,00
P02768	Serum albumin	43,89	2,46	609	69,3	6,28
Q9P275	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 36	9,77	2,05	1121	122,6	9,67

Tabela 4. Proteínas identificadas a partir da película adquirida formada *in situ* sobre o esmalte no tempo de 2 horas, após exposição ao ácido cítrico 1% pH 2,5 por 20 segundos.

Nº de acesso	Nome da proteína	Score	Coverage	# AAs	PM (kDa)	pI
B4DWU6	cDNA FLJ51361, highly similar to Keratin, type II cytoskeletal 6A	9,10	5,96	520	55,8	6,48
B4DRW1	cDNA FLJ55805, highly similar to Keratin, type II cytoskeletal 4	5,77	4,85	474	51,7	6,81
P08123	Collagen alpha-2(I) chain	9,08	2,34	1366	129,2	8,95
H6VRF8	Keratin 1	7,10	3,42	644	66,0	8,12
P35527	Keratin, type I cytoskeletal 9	45,60	13,16	623	62,0	5,24
P04264	Keratin, type II cytoskeletal 1	7,10	3,42	644	66,0	8,12
P35908	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal	11,62	5,95	639	65,4	8,00
P02538	Keratin, type II cytoskeletal 6A	6,37	4,61	564	60,0	8,00

Tabela 5. Proteínas identificadas a partir da película adquirida formada *in situ* sobre o esmalte no tempo de 10 minutos, após exposição ao ácido láctico 0,1 M pH 4,8 por 20 segundos.

Nº de acesso	Nome da proteína	Score	Coverage	# AAs	PM (kDa)	pI
Q8IUK7	ALB protein	19,84	3,79	396	45,1	6,10
H6VRF8	Keratin 1	18,51	12,11	644	66,0	8,12
P35527	Keratin, type I cytoskeletal 9	54,16	8,83	623	62,0	5,24
P04264	Keratin, type II cytoskeletal 1	18,51	12,11	644	66,0	8,12
P35908	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal	17,88	5,95	639	65,4	8,00
P02768	Serum albumin	19,84	2,46	609	69,3	6,28

Tabela 6. Proteínas identificadas a partir da película adquirida formada *in situ* sobre o esmalte no tempo de 2 horas, após exposição ao ácido láctico 0,1 M pH 4,8 por 20 segundos.

Nº de acesso	Nome da proteína	Score	Coverage	# AAs	PM (kDa)	pI
P35527	Keratin, type I cytoskeletal 9	37,11	13,16	623	62,0	5,24

A taxa de identificação de proteínas para a dentina foi maior, quando comparada ao esmalte. As proteínas, nos tempos de formação de 10 minutos e 2 horas estão listadas nas Tabelas 7 e 8, respectivamente, após exposição da película à água deionizada. No tempo de 10 minutos foram identificadas 66 proteínas, e no tempo de 2 horas, 52 proteínas. A exposição ao ácido cítrico reduziu bastante o número de proteínas identificadas, que foi 16 e 6 proteínas para os tempos de formação de 10 minutos e 2 horas, respectivamente (Tabelas 9 e 10). Após exposição ao ácido láctico, o número de proteínas identificadas foi bem parecido com o observado para a água deionizada (76 e 51 para os tempos de 10 minutos e 2 horas, Tabelas 11 e 12, respectivamente).

Tabela 7. Proteínas identificadas a partir da película adquirida formada in situ sobre a dentina no tempo de 10 minutos, após exposição à água deionizada por 20 segundos.

Nº de acesso	Nome da proteína	Score	Coverage	# AAs	PM (kDa)	pI
P58397	A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 12	6,97	4,33	1594	177,6	7,87
Q9UHB7	AF4/FMR2 family member 4	6,67	4,64	1163	127,4	9,31
Q9NS89	Alpha1A-voltage-dependent calcium channel (Fragment)	9,46	2,59	2472	278,7	8,81
A1YBP1	Breast and ovarian cancer susceptibility protein 2 truncated variant	13,23	4,64	2649	297,1	6,40
Q9UIF8	Bromodomain adjacent to zinc finger domain protein 2B	7,52	1,75	2168	240,3	6,54
Q8IZJ3	C3 and PZP-like alpha-2-macroglobulin domain-containing protein 8	6,61	2,92	1885	206,6	6,42
P07339	Cathepsin D - Homo sapiens (Human). - [CATD_HUMAN]	6,77	15,78	412	44,5	6,54
O15265	Ataxin-7	10,74	11,91	747	79,5	10,08
B7Z526	cDNA FLJ59292, highly similar to Homo sapiens neuron navigator 2 (NAV2), transcript variant 2, mRNA (Fragment)	9,21	10,29	816	85,6	9,44
Q0JRZ9	FCH domain only protein 2	7,53	8,11	777	85,1	6,86
Q96MF4	Coiled-coil domain-containing protein 140	6,21	19,63	163	18,2	10,64
B3KNQ0	Coiled-coil domain-containing protein 92	7,13	19,43	314	35,1	9,25
P08123	Collagen alpha-2(I) chain	15,48	3,44	1366	129,2	8,95
Q6LAN8	Collagen type I alpha 1 (Fragment)	5,26	3,09	1069	97,4	5,57
D3DTX7	Collagen, type I, alpha 1, isoform CRA_a	57,08	5,20	885	84,7	6,24
Q20BI7	CTTNBP2	6,58	3,55	1663	180,8	8,06
Q08495	Dematin	6,60	15,31	405	45,5	8,88
Q96JH7	Deubiquitinating protein VCIP135	7,40	4,83	1222	134,2	7,20
Q8TB52	F-box only protein 30	7,04	7,79	745	82,3	5,40
Q53EP0	Fibronectin type III domain-containing protein 3B	6,15	4,07	1204	132,8	5,95
Q59F85	Glucose phosphate isomerase variant (Fragment)	6,47	10,58	520	55,7	9,11
H0YAF8	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1 (Fragment)	5,77	25,76	198	22,0	6,33
G3V1J7	HCG2043693	4,78	33,59	131	14,0	10,08
C9J3N8	Heat shock protein beta-1	10,67	91,89	37	3,9	5,02
Q03164	Histone-lysine N-methyltransferase 2 ^a	9,94	2,44	3969	431,5	9,09
P13646	Keratin, type I cytoskeletal 13	5,84	7,64	458	49,6	4,96
P02533	Keratin, type I cytoskeletal 14	6,53	11,86	472	51,6	5,16
P35908	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal	12,65	16,59	645	65,8	8,00
Q7LBC6	Lysine-specific demethylase 3B	10,29	3,75	1761	191,5	7,18
E7EWQ5	Microtubule-associated serine/threonine-protein kinase 4	6,66	1,96	2444	266,0	8,66

G3CIG0	MUC19 variant 12	36,36	3,98	8384	804,8	5,01
Q8WXI7	Mucin-16	40,20	1,49	22152	2351,2	6,00
E7EPM4	Mucin-17	7,28	1,34	4262	425,3	4,03
E2RYF6	Mucin-22	6,93	3,84	1773	173,4	3,90
Q9HC84	Mucin-5B	13,08	3,38	5703	590,1	6,67
B1W6B2	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 5	10,13	10,89	606	67,4	9,10
A4GYN5	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 5	7,00	10,28	603	67,0	9,03
E9PAV3	Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha	16,63	8,37	2078	205,3	9,58
H0YHA8	Neuron navigator 3 (Fragment)	9,94	3,74	1258	135,9	7,71
O60346	PH domain leucine-rich repeat-containing protein phosphatase 1	7,35	2,50	1717	184,6	6,28
Q6IQ23	Pleckstrin homology domain-containing family A member 7	7,00	5,53	1121	127,1	9,35
Q15149	Plectin	10,05	1,73	4684	531,5	5,96
D6RAQ3	Prelamin-A/C	14,20	5,31	565	62,8	6,18
Q8IZF6	Probable G-protein coupled receptor 112	15,79	2,76	3080	333,2	6,21
E7EPW6	Programmed cell death protein 6	6,55	49,32	73	7,8	9,04
O60299	Leucine zipper putative tumor suppressor 3	8,59	8,62	673	71,7	7,64
Q8IVF2	Protein AHNAK2	6,63	1,00	5795	616,2	5,36
Q6P1L5	Protein FAM117B	9,52	11,21	589	61,9	9,82
F8VZN8	Protein phosphatase 1 regulatory subunit 12A (Fragment)	6,25	6,79	692	76,5	5,31
Q59H55	Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 13 isoform 2 variant (Fragment)	6,57	1,52	2434	271,3	6,52
Q5H9S0	Putative uncharacterized protein DKFZp781N1974	7,01	4,72	763	84,5	9,13
B3W6H7	Putative uncharacterized protein TET1-MLL (Fragment)	6,01	24,51	204	22,0	10,15
Q2M1Z3	Rho GTPase-activating protein 31	6,98	4,09	1444	156,9	5,76
O15085	Rho guanine nucleotide exchange factor 11	11,66	4,60	1522	167,6	5,50
Q9Y3L3	SH3 domain-binding protein 1	7,14	10,70	701	75,7	6,77
Q6S5L8	SHC-transforming protein 4	5,76	8,10	630	68,7	7,84
A4D1A8	Similar to Piccolo protein (Aczonin)	11,13	2,56	3717	410,9	5,40
A4D236	Similar to polycystic kidney disease 1-like 3	6,89	10,69	683	74,4	11,65
F5H376	SRC kinase-signaling inhibitor 1	9,03	6,95	921	98,4	9,17
Q9P2P6	StAR-related lipid transfer protein 9	10,74	1,77	4700	516,0	6,32
Q8IY92	Structure-specific endonuclease subunit SLX4	6,17	3,05	1834	199,9	6,06
C0JYZ2	Titin	15,14	0,38	33423	3711,4	6,52
P31629	Transcription factor HIVP2	6,26	2,49	2446	268,9	6,96
H3BTF6	Uncharacterized protein C16orf59 (Fragment)	9,55	14,39	285	30,4	9,88
Q9UF83	Uncharacterized protein DKFZp434B061	6,46	12,06	564	59,4	13,07
Q86UP3	Zinc finger homeobox protein 4	7,15	1,99	3567	393,5	6,37

Tabela 8. Proteínas identificadas a partir da película adquirida formada *in situ* sobre a dentina no tempo de 2 horas, após exposição à água deionizada por 20 segundos.

Nº de acesso	Nome da proteína	Score	Coverage	# AAs	PM (kDa)	pI
Q8TE57	A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 16	6,50	5,07	1224	136,1	8,63
Q9UKA4	A-kinase anchor protein 11	6,40	3,16	1901	210,4	5,39
Q86UK0	ATP-binding cassette sub-family A member 12	5,88	1,93	2595	293,0	7,75
B3KW15	cDNA FLJ43124 fis, clone CTONG3004072, highly similar to Protein EMSY	13,21	6,05	1224	130,7	9,31
B4DTI2	cDNA FLJ50211, highly similar to Collagen alpha-1(XVII) chain	7,66	6,35	614	64,4	9,35
B4E2I9	cDNA FLJ55486, highly similar to Semaphorin-3C	6,31	7,28	769	87,1	8,79
B4DEF9	cDNA FLJ59241, highly similar to Transducin-like enhancer protein 1	6,44	7,28	755	81,7	7,24
B7Z727	cDNA FLJ61605, highly similar to Homo sapiens DALR anticodon binding domain containing 3 (DALRD3), transcript variant 1, mRNA	6,54	6,21	483	52,3	7,62
A8K6N7	cDNA FLJ78671	6,48	6,92	838	91,6	6,35
B2RDJ7	cDNA, FLJ96642, highly similar to Homo sapiens gephyrin (GPHN), mRNA	6,19	4,42	769	83,3	5,58
G3V3F4	Centrosomal protein of 128 kDa (Fragment)	6,93	26,56	128	14,2	7,58
P08218	Chymotrypsin-like elastase family member 2B	6,86	20,82	269	28,8	6,93
P08123	Collagen alpha-2(I) chain	23,74	4,03	1366	129,2	8,95
D3DTX7	Collagen, type I, alpha 1, isoform CRA_a	65,57	10,17	885	84,7	6,24
Q86T13	C-type lectin domain family 14 member A	7,27	12,86	490	51,6	6,35
G5E9L9	Doublecortin and CaM kinase-like 2, isoform CRA_c	5,40	6,47	695	76,1	8,54
Q6DEN2	DPYSL3 protein	23,98	3,22	684	73,9	6,55
B4DX66	Epidermal growth factor receptor kinase substrate 8	5,36	7,12	562	62,8	8,90
B9EK47	HEAT repeat containing 5B	6,26	2,51	2071	224,1	7,18
Q96RW7	Hemicentin-1	6,82	0,96	5635	613,0	6,49
H0Y765	Histone-lysine N-methyltransferase MLL3 (Fragment)	5,31	2,69	1524	168,4	8,27
Q5JU85	IQ motif and SEC7 domain-containing protein 2	6,46	3,79	1478	161,6	8,56
Q2M2I5	Keratin, type I cytoskeletal 24	5,79	9,71	525	55,1	4,96
P35527	Keratin, type I cytoskeletal 9	6,57	9,47	623	62,1	5,30
E9PRX9	Kin of IRRE-like protein 3	5,65	5,87	766	84,1	7,02

P11137	Microtubule-associated protein 2	6,59	10,55	559	58,9	9,72
Q9NXL9	DNA helicase MCM9	5,06	5,99	601	67,5	6,61
G3CIG0	MUC19 variant 12	18,71	2,00	8384	804,8	5,01
B5ME49	Mucin-16	33,87	1,67	14507	1518,2	5,26
Q7Z5P9	Mucin-19	12,42	1,89	6254	597,8	5,00
Q02505	Mucin-3A	6,57	2,13	2541	265,7	5,49
P98088	Mucin-5AC (Fragments)	9,16	1,79	5030	526,3	6,90
Q9HC84	Mucin-5B	15,21	3,37	5703	590,1	6,67
B9EGI2	Myosin phosphatase Rho interacting protein	6,04	4,53	1037	118,0	6,39
E9PAV3	Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha	13,68	5,68	2078	205,3	9,58
Q12830	Nucleosome-remodeling factor subunit BPTF	7,61	1,84	3046	338,1	6,54
Q8TAK6	Oligodendrocyte transcription factor 1	6,94	11,44	271	27,9	9,66
B7ZM65	PHRF1 protein	5,91	2,98	1645	178,1	9,01
Q5VWN6	Protein FAM208B	6,64	2,88	2430	268,7	5,90
F8VZN8	Protein phosphatase 1 regulatory subunit 12A (Fragment)	8,35	7,23	692	76,5	5,31
Q9Y6V0	Protein piccolo	6,45	0,93	5065	552,9	6,51
Q9C0D5	Protein TANC1	6,78	2,63	1861	202,1	8,32
A4CZ08	Putative uncharacterized protein DKFZp727A051 (Fragment)	10,67	18,81	319	33,8	5,08
F6KSS9	RAD21L	6,93	10,07	556	63,3	5,20
Q5T6P1	SLAIN motif family, member 1 (Fragment)	6,51	15,35	228	25,6	6,34
Q8TBP0	TBC1 domain family member 16	6,22	5,74	767	86,3	5,82
C0JYZ2	Titin	20,92	0,50	33423	3711,4	6,52
Q5T2D2	Trem-like transcript 2 protein	6,04	13,71	321	35,1	9,63
Q9Y2F5	Uncharacterized protein KIAA0947	9,71	1,94	2266	247,7	5,48
Q6UXI7	Vitrin	6,72	8,52	657	71,8	9,29
H7C022	WD repeat-containing protein 60 (Fragment)	5,65	9,58	522	60,6	6,65
Q9ULM3	YEATS domain-containing protein 2	6,92	4,71	1422	150,7	8,98

Tabela 9. Proteínas identificadas a partir da película adquirida formada *in situ* sobre a dentina no tempo de 10 minutos, após exposição ao ácido cítrico 1% pH 2,5 por 20 segundos.

Nº de acesso	Nome da proteína	Score	Coverage	# AAs	PM (kDa)	pI
	cDNA FLJ13966 fis, clone					
Q9H834	Y79AA1001394, weakly similar to CELL DIVISION PROTEIN FTSH HOMOLOG (EC 3.4.24.-)	6,08	8,33	480	53,5	9,45
P08123	Collagen alpha-2(I) chain	19,67	3,73	1366	129,2	8,95
D3DTX7	Collagen, type I, alpha 1, isoform CRA_a	93,14	3,50	885	84,7	6,24
Q6DEN2	DPYSL3 protein	16,75	3,22	684	73,9	6,55
P08F94	Fibrocystin	6,48	1,60	4074	446,4	6,57
P01876	Ig alpha-1 chain C region	6,32	9,94	493	52,8	7,11
H6VRF9	Keratin 1	5,89	8,23	644	66,0	7,80
O60382	KIAA0324 (Fragment)	5,74	2,01	1791	191,2	11,93
P11137	Microtubule-associated protein 2	6,56	3,28	1827	199,4	4,91
G3CIG0	MUC19 variant 12	9,72	1,23	8384	804,8	5,01
B5ME49	Mucin-16	22,95	1,54	14507	1518,2	5,26
E7EPM4	Mucin-17	6,95	1,60	4262	425,3	4,03
E7EUA9	Neuron navigator 3	7,02	2,56	2186	234,9	8,56
Q9H4M7	Pleckstrin homology domain- containing family A member 4	5,73	3,72	779	85,3	10,56
Q9Y4G6	Talin-2	6,14	1,81	2542	271,4	5,57
Q9Y2F5	Uncharacterized protein KIAA0947	10,09	2,25	2266	247,7	5,48

Tabela 10. Proteínas identificadas a partir da película adquirida formada *in situ* sobre a dentina no tempo de 2 horas, após exposição ao ácido cítrico 1% pH 2,5 por 20 segundos.

Nº de acesso	Nome da proteína	Score	Coverage	# AAs	PM (kDa)	pI
E5RHJ2	Aspartyl/asparaginyl beta- hydroxylase	6,78	25,66	113	11,8	6,79
O95171	Sciellin	9,95	7,74	646	72,7	9,22
A8K670	cDNA FLJ75703, highly similar to Homo sapiens nitric oxide synthase interacting protein (NOSIP), mRNA	6,69	18,27	301	33,2	8,82
O60307	Microtubule-associated serine/threonine-protein kinase 3	10,26	3,36	1309	143,0	8,06
Q9HC84	Mucin-5B	8,85	0,84	5703	590,1	6,67
C0JYZ2	Titin	25,19	0,30	33423	3711,4	6,52

Tabela 11. Proteínas identificadas a partir da película adquirida formada *in situ* sobre a dentina no tempo de 10 minutos, após exposição ao ácido láctico 0,1 M pH 4,8 por 20 segundos.

Nº de acesso	Nome da proteína	Score	Coverage	# AAs	PM (kDa)	pI
Q13085	Acetyl-CoA carboxylase 1	7,41	2,81	2346	265,4	6,37
Q8N957	Ankyrin repeat and fibronectin type-III domain-containing protein 1	6,44	8,26	763	87,5	8,40
F8VU39	Bromodomain adjacent to zinc finger domain protein 2A	5,26	1,73	1903	210,8	6,67
Q2F3K1	Calcium sensing receptor (Fragment)	5,42	4,19	501	55,9	7,64
F8VVY1	CCR4-NOT transcription complex subunit 2 (Fragment)	6,46	32,79	183	19,9	9,99
Q8TCH5	CDNA FLJ23893 fis, clone LNG14589	6,59	25,84	178	18,8	12,23
B3KNQ8	cDNA FLJ30174 fis, clone BRACE2000975, highly similar to Sodium/potassium-transporting ATPase alpha-3 chain (EC 3.6.3.9)	8,79	11,72	435	48,1	5,41
B3KXP1	cDNA FLJ45802 fis, clone NT2RI3001967, highly similar to Ankyrin repeat and SAM domain-containing protein 6	5,74	4,44	676	72,5	8,97
B7Z5K0	cDNA FLJ52445, highly similar to Homo sapiens membrane-associated ring finger (C3HC4) 7 (MARCH7), mRNA	13,66	13,86	635	70,1	8,15
B4DII4	cDNA FLJ53493, highly similar to HEF-like protein	6,01	7,65	732	81,1	7,09
B7Z809	cDNA FLJ56016, highly similar to C-1-tetrahydrofolate synthase, cytoplasmic	7,22	5,59	1020	110,4	8,56
B7Z8W9	cDNA FLJ56525, highly similar to Disks large-associated protein 1	7,57	6,03	929	103,5	6,77
B4DYI8	cDNA FLJ57670, highly similar to Endoglin	10,12	24,36	390	41,8	7,37
B4DR27	cDNA FLJ58607, highly similar to Zinc finger protein basophilin-2	6,61	4,98	1004	111,4	6,68
B4DYX7	cDNA FLJ58647, highly similar to Signal-induced proliferation-associated 1-like protein 1	6,29	3,98	1257	139,4	8,18
B7Z4I5	cDNA FLJ58675, highly similar to Band 4.1-like protein 3	4,78	4,19	883	98,4	5,29
B4DEF2	cDNA FLJ59851, highly similar to DNA methyltransferase 1-associated protein 1	7,24	23,14	229	25,2	10,01
B2RDX7	cDNA, FLJ96814, highly similar to Homo sapiens CCR4-NOT transcription complex, subunit 2 (CNOT2), mRNA	9,72	10,19	540	59,7	7,66
Q9P209	Centrosomal protein of 72 kDa	6,36	8,50	647	71,7	6,52
Q6P5Z9	CLIP1 protein (Fragment)	9,60	8,73	653	71,7	7,56
P02452	Collagen alpha-1(I) chain	63,54	9,02	1464	138,9	5,80
P08123	Collagen alpha-2(I) chain	51,08	4,39	1366	129,2	8,95
D3DTX7	Collagen, type I, alpha 1, isoform CRA_a	233,39	7,91	885	84,7	6,24
Q8TD11	Decay-accelerating factor 4b (Fragment)	6,45	13,84	419	44,8	9,67
A2A370	Dedicator of cytokinesis 8	6,39	7,06	439	49,5	7,80
G3V1B5	Down syndrome cell adhesion molecule like 1, isoform CRA_a	6,60	2,88	1843	201,0	8,35
F8W9J4	Dystonin	5,66	0,58	7461	847,4	5,25
E7EMW7	E3 ubiquitin-protein ligase UBR5	6,52	2,15	2792	308,4	5,85
Q5CZC0	Fibrous sheath-interacting protein 2	9,90	1,13	6907	780,1	6,71
D3DX93	HCG1745555, isoform CRA_b	6,85	1,51	3184	353,4	6,30
B4DL87	cDNA FLJ52243, highly similar to Heat-shock protein beta-1	8,90	28,24	170	18,5	6,95

Q9NR48	Histone-lysine N-methyltransferase ASH1L	6,71	2,09	2969	332,6	9,39
Q03164	Histone-lysine N-methyltransferase 2A	12,24	1,56	3969	431,5	9,09
H6VRF8	Keratin 1	12,37	7,92	644	66,0	8,12
P13646	Keratin, type I cytoskeletal 13	6,77	7,64	458	49,6	4,96
P35527	Keratin, type I cytoskeletal 9	12,74	13,16	623	62,1	5,30
P04264	Keratin, type II cytoskeletal 1	12,44	12,58	644	66,0	8,12
P35908	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal	6,54	10,08	645	65,8	8,00
Q9NQT8	Kinesin-like protein KIF13B	11,43	4,93	1826	202,5	5,78
Q9P2V4	Leucine-rich repeat, immunoglobulin-like domain and transmembrane domain-containing protein 1	6,41	4,65	623	68,0	8,54
F8WD26	LIM domain only protein 7	7,35	3,35	1614	185,0	7,97
Q9NR99	Matrix-remodeling-associated protein 5	6,06	1,84	2828	312,0	8,32
E7ERL6	Microtubule-associated serine/threonine-protein kinase 2	9,43	3,42	1608	176,0	7,65
O43283	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 13	10,57	8,59	966	108,2	6,49
G3CIG0	MUC19 variant 12	39,61	4,32	8384	804,8	5,01
Q8WXI7	Mucin-16	19,39	0,80	22152	2351,2	6,00
B5ME49	Mucin-16	19,84	1,26	14507	1518,2	5,26
Q9HC84	Mucin-5B	21,35	3,26	5703	590,1	6,67
Q9BX99	Mutant early onset breast cancer susceptibility protein 2 (Fragment)	9,80	13,15	715	79,5	6,28
A7E2D6	NAV2 protein	8,82	2,38	2432	261,6	8,98
Q14918	Nebulin (Fragment)	6,83	9,30	559	64,4	9,28
F8W8T3	Obscurin	6,61	1,52	3739	407,4	5,25
Q9UKJ0	Paired immunoglobulin-like type 2 receptor beta	6,64	14,54	227	25,5	10,37
H3BQM0	PAP-associated domain-containing protein 5	9,99	12,07	588	64,7	8,70
Q96Q06	Perilipin-4	12,84	11,94	1357	134,3	8,73
Q9H4M7	Pleckstrin homology domain-containing family A member 4	6,95	5,52	779	85,3	10,56
Q9NTG1	Polycystic kidney disease and receptor for egg jelly-related protein	5,76	1,91	2253	255,3	9,11
Q9H6S0	Probable ATP-dependent RNA helicase YTHDC2	6,46	4,83	1430	160,1	8,40
Q504W3	Uncharacterized protein (Fragment)	6,48	34,78	138	14,5	12,04
Q08AI6	Putative sodium-coupled neutral amino acid transporter 11	6,99	7,88	406	44,8	6,60
Q6M1B8	Putative uncharacterized protein DKFZp686J06106	7,34	4,48	1162	131,7	10,05
Q8N1G1	RNA exonuclease 1 homolog	6,15	4,18	1221	131,4	8,95
Q8IWY4	Signal peptide, CUB and EGF-like domain-containing protein 1	6,31	5,16	988	107,8	6,83
A7MD96	SYNPO protein (Fragment)	17,09	9,02	887	94,7	9,74
Q5UIP0	Telomere-associated protein RIF1	7,34	2,51	2472	274,3	5,52
F5H2D1	Teneurin-2	7,90	1,77	2773	307,6	6,65
C0JYZ2	Titin	36,66	0,68	33423	3711,4	6,52
Q9H2D6	TRIO and F-actin-binding protein	7,13	2,75	2365	261,2	8,48
A6NCA8	Ubiquitin-associated protein 2	9,82	10,56	852	87,8	8,16
Q9Y2F5	Uncharacterized protein KIAA0947	19,51	3,05	2266	247,7	5,48
H0Y781	Uncharacterized protein KIAA1109 (Fragment)	5,70	2,63	1674	185,1	6,98
H7C2C1	Uncharacterized protein	6,49	28,49	186	20,2	11,56
Q8IUG5	Unconventional myosin-XVIIIb	7,01	2,34	2567	285,0	6,86
C9JVC3	Zinc finger protein 717	6,43	6,25	864	100,4	8,78
A6NM28	Zinc finger protein 92 homolog	6,30	8,17	416	45,8	10,20
Q86SH2	Zygote arrest protein 1	11,59	15,57	424	45,8	9,06

Tabela 12. Proteínas identificadas a partir da película adquirida formada *in situ* sobre a dentina no tempo de 2 horas após exposição ao ácido láctico 0,1 M pH 4,8 por 20 segundos.

Nº de acesso	Nome da proteína	Score	Coverage	# AAs	PM (kDa)	pl
Q8TAX5	AFF4 protein	9,93	22,19	365	40,2	9,51
Q12955	Ankyrin-3	6,82	0,85	4377	480,1	6,49
F8VVT9	Arf-GAP with GTPase, ANK repeat and PH domain-containing protein 2	6,79	3,78	1192	124,5	9,86
Q9ULK2	Ataxin-7-like protein 1	6,00	6,16	861	91,5	9,79
Q9H986	cDNA FLJ12923 fis, clone NT2RP2004681, weakly similar to NEUROFILAMENT TRIPLET H PROTEIN	6,67	8,00	725	78,6	5,43
Q96K89	cDNA FLJ14438 fis, clone HEMBB1000317, weakly similar to FIBULIN-1, ISOFORM D	6,49	8,64	741	81,8	6,28
Q8TCH5	CDNA FLJ23893 fis, clone LNG14589	5,65	25,84	178	18,8	12,23
B4E223	cDNA FLJ52075, moderately similar to Mus musculus SPT2, Suppressor of Ty, domain containing 1, mRNA	9,73	10,17	629	68,5	9,85
B4DKU3	cDNA FLJ53449, highly similar to rRNA methyltransferase 3 (EC 2.1.1.-)	6,67	8,26	726	82,5	6,38
B4DSJ6	cDNA FLJ54510, highly similar to Adenylate cyclase type 2 (EC 4.6.1.1)	10,29	6,58	760	85,9	8,00
A8K5X9	cDNA FLJ77989, highly similar to Homo sapiens RNA binding motif protein 19, mRNA	6,32	3,13	960	107,3	6,48
Q8IYE1	Coiled-coil domain-containing protein 13	6,24	7,13	715	80,8	8,84
P08123	Collagen alpha-2(I) chain	9,13	2,34	1366	129,2	8,95
D3DTX7	Collagen, type I, alpha 1, isoform CRA_a	53,10	5,20	885	84,7	6,24
B2RNN3	Complement C1q and tumor necrosis factor-related protein 9B	11,87	10,51	333	34,7	8,12
P32926	Desmoglein-3 - Homo sapiens (Human). - [DSG3_HUMAN]	6,76	7,01	999	107,4	5,00
O60469	Down syndrome cell adhesion molecule	6,56	1,94	2012	222,1	7,68
P02675	Fibrinogen beta chain [Contains: Fibrinopeptide B]	6,25	6,31	491	55,9	8,27

F8W7G7	Ugl-Y3	8,92	2,31	2211	243,1	5,72
Q6NWM5	G protein-coupled receptor 21	5,74	13,75	349	39,5	7,88
Q5DT20	Hornerin	10,08	5,54	2850	282,2	10,0
						2
P11215	Integrin alpha-M	6,56	2,26	1152	127,1	7,23
H6VRF8	Keratin 1	6,95	10,40	644	66,0	8,12
P13646	Keratin, type I cytoskeletal 13	6,91	11,57	458	49,6	4,96
P35527	Keratin, type I cytoskeletal 9	9,07	7,38	623	62,0	5,24
Q96T58	Msx2-interacting protein	10,53	2,51	3664	402,0	7,64
G3CIG0	MUC19 variant 12	20,23	2,39	8384	804,8	5,01
B5ME49	Mucin-16	26,48	1,61	14507	1518,2	5,26
Q7Z5P9	Mucin-19	17,26	2,69	6254	597,8	5,00
Q9HC84	Mucin-5B	9,48	2,67	5703	590,1	6,67
Q7Z5W2	MYT1 protein (Fragment)	6,87	6,86	846	92,1	6,32
F5H6D8	N6-adenosine-methyltransferase 70 kDa subunit	6,66	26,94	245	26,3	6,89
E9PAV3	Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha	13,88	5,49	2078	205,3	9,58
P43146	Netrin receptor DCC	7,00	3,52	1447	158,4	6,77
P21359	Neurofibromin	6,33	1,87	2839	319,2	7,39
Q96Q06	Perilipin-4	9,88	7,30	1357	134,3	8,73
Q5VV67	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-related protein 1	6,02	2,94	1664	177,4	6,51
F5GXI6	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate 5-phosphatase 1	5,80	7,38	596	67,5	7,23
O75592	Probable E3 ubiquitin-protein ligase MYCBP2	5,80	1,10	4640	509,8	7,03
E9PQY0	Protein FAM220A (fragment)	7,00	46,67	120	12,7	8,51
Q96RK0	Protein capicua homolog	6,52	3,92	1608	163,7	8,56
Q9C0D5	Protein TANC1	9,23	3,39	1861	202,1	8,32
Q49AI5	REV1 protein	6,65	6,10	1114	122,3	8,76
Q9NRC6	Spectrin beta chain, non-erythrocytic 5	6,84	1,39	3674	416,6	6,67
Q5TAX3	Terminal uridylyltransferase 4	12,04	3,10	1644	185,0	7,97
Q8WZ42	Titin	27,82	0,64	34350	3813,7	6,35
B7WPF4	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase	6,53	2,11	2460	277,2	6,28
Q9Y2F5	Uncharacterized protein KIAA0947	13,52	2,38	2266	247,7	5,48
Q2LD37	Uncharacterized protein KIAA1109	6,88	1,18	5005	555,1	6,58
B4DZC3	5'-3' exoribonuclease 2	6,28	6,70	896	102,4	7,64
Q86UP3	Zinc finger homeobox protein 4	6,27	1,74	3567	393,5	6,37

O diagrama de Venn demonstra o número total de proteínas identificadas para cada substrato e tempo de formação da película adquirida (esmalte 10 minutos e 2 horas; dentina 10 minutos e 2 horas), e as sobreposições entre os três diferentes meios de imersão (Figura 7). Para o esmalte, após 10 minutos de formação da película, um total de 4 proteínas, todas elas pertencentes à família das queratinas, estiverem presentes em todos os diferentes meios de imersão (*Keratin 1*; *Keratin, type I cytoskeletal 9*; *Keratin, type II cytoskeletal 1* e *Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal*). Três proteínas estavam presentes apenas no grupo tratado com ácido cítrico (*cDNA FLJ58275, highly similar to Keratin, type II cytoskeletal 4*; *Keratin, type I cytoskeletal 10* e *Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 36*) e outras 2 foram detectadas apenas nos grupos tratados com ácido cítrico e láctico, ambas pertencentes à família das albuminas (*ALB protein* e *Serum albumin*). Já para o esmalte após 2 horas de formação da película, apenas 1 proteína foi comum a todos os meios de imersão, também da família das queratinas (*Keratin, type I cytoskeletal 9*). Vale ressaltar que esta proteína também foi comum a todos os meios de imersão para o esmalte tratado por 10 minutos. Consistente com a literatura, proteínas da família das queratinas vêm sendo consistentemente identificadas na película adquirida (LEE et al., 2013; MASSON et al., 2013; SIQUEIRA et al., 2012; SIQUEIRA; CUSTODIO; MCDONALD, 2012; SIQUEIRA et al., 2010; SIQUEIRA; OPPENHEIM, 2009; SIQUEIRA et al., 2007; ZIMMERMAN et al., 2013).

Continuando a análise do esmalte, 3 e 4 proteínas identificadas foram exclusivamente detectadas nos grupos tratados com ácido cítrico, na película formada por 10 minutos e 2 horas, respectivamente (Tabela 13). Duas destas proteínas identificadas na película tratada com ácido cítrico por 2 horas (*cDNA FLJ51361, highly similar to Keratin, type II cytoskeletal 6* e *cDNA FLJ55805, highly similar to Keratin, type II cytoskeletal 4*) também foram descritas por Zimmerman et al. (2013), na película adquirida formada sobre o esmalte de dentes decíduos *in vivo*, as quais fazem interação proteína/proteína e, na película adquirida, têm a função de regeneração de tecidos.

Para a dentina, na película formada por 10 minutos, um total de 3 proteínas estavam presentes em todos os diferentes meios de imersão, sendo 2 pertencentes à família do colágeno e 1 à família da mucina (*Collagen alpha-2(I) chain*; *Collagen, type I, alpha 1 isoform CRA_a* e *MUC19 variant 12*). É possível que os colágenos identificados sejam oriundos da dentina e não sejam constituintes da película

propriamente dita, especialmente nos casos em que foi feita imersão nos ácidos cítrico e láctico. Já a presença de mucina (*MUC19 variant 12*) indica que esta proteína, secretada pelas glândulas salivares e traqueia (SAMUELS et al., 2008), possa ser resistente aos desafios ácidos na película formada sobre a dentina em curto espaço de tempo. Sabe-se que as mucinas estão entre as proteínas precursoras da película adquirida formada sobre o esmalte (SIQUEIRA; CUSTODIO; MCDONALD, 2012). Em adição, transcritos de mucina 1-5, 7, 9, 13, 15, 16 e 18-20 são detectados no epitélio da laringe normal, enquanto que as mucinas 2, 3 e 5 são expressas em baixos níveis em pacientes com injúria na laringe atribuída ao refluxo (SAMUELS et al., 2008). O principal papel descrito para as mucinas é o de lubrificação (HANNIG, M.; JOINER, 2006; SIQUEIRA et al., 2007). Recentemente, foi relatado que a mucina (0,27%) associada à caseína (0,5%), mas não a mucina (0,27%) isoladamente, significativamente melhorou as propriedades de inibição da erosão da película adquirida humana, sugerindo que interações proteína-proteína são importantes na efetividade da película em prevenir a erosão dentária (CHEHAIB; LUSSI, 2011). Tem sido demonstrado que a complexação de diferentes proteínas guia a adsorção seletiva de proteínas à superfície dentária. Um exemplo disto é mucina de alto peso molecular (MG1), que se coordena com a IgA secretora, sendo que este complexo contribui para a formação da estrutura globular da película (TABAK, 1990).

Chehaib e Lussi (2011) sugeriram que uma estrutura micelar poderia ser formada entre a mucina e a caseína, resultando num aumento da espessura da película e/ou densidade e ligação cruzada. Assim, estudos futuros deveriam investigar o potencial protetor da película modificada pelo enriquecimento com mucina associada a outras proteínas.

Continuando a análise no tempo de 10 minutos de formação da película, 9 proteínas estavam presentes apenas no grupo exposto ao ácido cítrico, 64 no exposto ao ácido láctico e 56 apenas no exposto à água deionizada (Figura 7). De especial interesse são as 6 proteínas que aparecem tanto nos grupos expostos ao ácido cítrico quanto ao ácido láctico, uma vez que estas parecem ter um bom potencial protetor, conferindo ácido-resistência à película formada em curto prazo sobre a dentina (*Collagen alpha-2(I) chain; Collagen, type I, alpha 1, isoform CRA_a; MUC19 variant 12; Mucin-16; Pleckstrin homology domain-containing family A member 4; Uncharacterized protein KIAA0947*). Dentre estas, vale a pena destacar

novamente as mucinas, sendo que a 19 está presente em todos os grupos, enquanto que a 16 foi identificada somente quando realizou-se exposição aos ácidos cítrico e láctico.

Estes resultados sugerem que as mucinas, em especial as isoformas 16 e 19, quando incorporadas à película adquirida formada em curto tempo sobre a dentina são resistentes à remoção por ácidos, e, portanto, são potenciais alvos para o enriquecimento da película com as mesmas, visando a conferir ácido-resistência à dentina, o que deveria ser testado usando protocolos apropriados *in situ* ou clínicos. Encontrou-se, dentre estas proteínas uma ainda não caracterizada. Sua futura caracterização poderá abrir novas perspectivas no entendimento das funções da película, em especial sua propriedade de ácido resistência. Deve-se destacar também a presença da *Pleckstrin homology domain-containing family A member 4*. Relata-se que o domínio *Pleckstrin homology* (PH) determina a localização subcelular e/ou atividade das proteínas contendo este domínio, por interagir com determinados fosfolídeos, incluindo o fosfoinosítídeo (KIMURA et al., 2013). Assim, a resistência desta proteína à sua remoção da película por ácidos pode ser devido à sua interação com lipídeos da película.

Os lipídeos constituem cerca de 25% do peso seco da película (SLOMIANY et al., 1986) e componentes lipofílicos são capazes de modular a composição e ultraestrutura da película. Por isto, tem sido especulado que uma película enriquecida por lipídeos pode ser mais resistente em casos de exposição ácida e poderia reduzir a erosão (KENSCHKE et al., 2013), como pode acontecer com a cárie (SLOMIANY et al., 1986). Entretanto, nem a composição lipídica da saliva e da película nem as interações dos lipídeos com a camada de película foram apropriadamente caracterizados até o momento e a evidência para este impacto benéfico ainda é limitada (KENSCHKE et al., 2013). Futuros estudos deveriam abordar estas interações entre lipídeos e proteínas da película, que poderiam levar ao *design* de novos produtos preventivos contra a desmineralização.

Na película formada sobre a dentina por 10 minutos, 4 proteínas apareceram tanto nos grupos expostos ao ácido cítrico quanto à água deionizada (*alpha-2(I) chain; Collagen, type I, alpha 1, isoform CRA_a; MUC19 variant 12; Mucin-17*) e 9 proteínas nos grupos expostos ao ácido láctico e água deionizada (*Collagen alpha-2(I) chain; Collagen, type I, alpha 1, isoform CRA_a; Histone-lysine N-*

methyltransferase 2; Keratin, type I cytoskeletal 13; Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal; MUC19 variant 12; Mucin-16; Mucin-5B; Titin).

Já no tempo de formação da película de 2 horas sobre a dentina, apenas 1 proteína, novamente uma mucina, a *Mucin-5B*, estava presente em todos os meios de imersão, confirmando o caráter resistente à remoção por ácidos das mucinas, observado para a película formada por 10 minutos. Em adição, 4 proteínas estavam presentes apenas no grupo tratado com ácido cítrico (*Aspartyl/asparaginyl beta-hydroxylase; cDNA FLJ75703, highly similar to Homo sapiens nitric oxide synthase interacting protein - NOSIP, mRNA; Microtubule-associated serine/threonine-protein kinase 3 e Sciellin*), 41 apenas no grupos tratado com ácido láctico e 41 foram exclusivas do grupo tratado com água deionizada (Figura 7).

A proteína que se mostrou resistente à remoção por ácidos cítrico e láctico na película formada por 2 horas foi a *Mucin-5B*, enquanto que 2 proteínas apareceram após exposição ao ácido cítrico e água deionizada (*Mucin-5B; Titin*) e outras 10 foram comuns aos grupos tratados com ácido láctico e água deionizada (*Collagen alpha-2(I) chain; Collagen, type I, alpha 1, isoform CRA_a; Keratin, type I cytoskeletal 9; MUC19 variant 12; Mucin-16; Mucin-19; Mucin-5B; Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha; Protein TANC1; Uncharacterized protein KIAA0947*). Vale a pena destacar uma das proteínas que foi observada exclusivamente no grupo tratado com ácido cítrico, a *Sciellin*. Trata-se de uma proteína que é capaz de sofrer ligação cruzada pela transglutaminase (BADEN et al., 2005). A habilidade da transglutaminase em realizar ligações cruzadas com outras proteínas da película, como PRPs, histatinas e cistatinas é capaz de conferir resistência à película, devido a reduzir as alterações conformacionais nestas proteínas (HANNIG, C.; SPITZMULLER; HANNIG, 2009a). Portanto, a *Sciellin* também pode ser uma proteína potencialmente protetora que poderia ser adicionada a produtos odontológicos.

Quando se avaliaram as proteínas identificadas apenas nos diferentes grupos de tratamento, para o ácido cítrico 8 e 4 proteínas estavam presentes exclusivamente após exposição a este ácido, nos tempos de 10 minutos e 2 horas, respectivamente. O número correspondente de proteínas exclusivas nos grupos tratados com ácido láctico foi de 60 e 36, respectivamente. Já para a água deionizada, foi 53 e 39, respectivamente (Tabela 14).

Figura 7. Diagrama de Venn mostrando a relação do número de proteínas identificadas em cada grupo e suas interações.

Tabela 2. Proteínas presentes exclusivamente a partir da película adquirida formada *in situ* sobre o esmalte.

	Nº de acesso	Descrição
Esmalte ácido cítrico 10 minutos	B4DRS2	cDNA FLJ58275, highly similar to Keratin, type II cytoskeletal 4
	P13645	Keratin, type I cytoskeletal 10
	Q9P275	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 36
Esmalte ácido cítrico 2 horas	Nº de acesso	Descrição
	B4DWU6	cDNA FLJ51361, highly similar to Keratin, type II cytoskeletal 6A
	B4DRW1	cDNA FLJ55805, highly similar to Keratin, type II cytoskeletal 4
	P08123	Collagen alpha-2(I) chain
	P02538	Keratin, type II cytoskeletal 6A

Tabela 3. Proteínas presentes exclusivamente a partir da película adquirida formada *in situ* sobre a dentina.

	Nº de acesso	Descrição
Dentina ácido cítrico 10 minutos	Q9H834	cDNA FLJ13966 fis, clone Y79AA1001394, weakly similar to CELL DIVISION PROTEIN FTSH HOMOLOG (EC 3.4.24.-)
	P08F94	Fibrocystin
	P01876	Ig alpha-1 chain C region
	H6VRF9	Keratin 1
	O60382	KIAA0324 (Fragment)
	P11137	Microtubule-associated protein 2
	E7EUA9	Neuron navigator 3
	Q9Y4G6	Talin-2
Dentina ácido cítrico 2 horas	Nº de acesso	Descrição
	E5RHJ2	Aspartyl/asparaginyl beta-hydroxylase
	A8K670	cDNA FLJ75703, highly similar to Homo sapiens nitric oxide synthase interacting protein (NOSIP), mRNA
	O60307	Microtubule-associated serine/threonine-protein kinase 3
	O95171	Sciellin
Dentina ácido láctico 10 minutos	Nº de acesso	Descrição
	Q13085	Acetyl-CoA carboxylase 1
	Q8N957	Ankyrin repeat and fibronectin type-III domain-containing protein 1
	F8VU39	Bromodomain adjacent to zinc finger domain protein 2A
	Q2F3K1	Calcium sensing receptor (Fragment)
	F8VYY1	CCR4-NOT transcription complex subunit 2 (Fragment)
	B3KNQ8	cDNA FLJ30174 fis, clone BRACE2000975, highly similar to Sodium/potassium-transporting ATPase

	alpha-3 chain (EC 3.6.3.9)
<i>B3KXP1</i>	cDNA FLJ45802 fis, clone NT2RI3001967, highly similar to Ankyrin repeat and SAM domain-containing protein 6
<i>B4DL87</i>	cDNA FLJ52243, highly similar to Heat-shock protein beta-1
<i>B7Z5K0</i>	cDNA FLJ52445, highly similar to Homo sapiens membrane-associated ring finger (C3HC4) 7 (MARCH7), mRNA
<i>B4DII4</i>	cDNA FLJ53493, highly similar to HEF-like protein
<i>B7Z809</i>	cDNA FLJ56016, highly similar to C-1-tetrahydrofolate synthase, cytoplasmic
<i>B7Z8W9</i>	cDNA FLJ56525, highly similar to Disks large-associated protein 1
<i>B4DYI8</i>	cDNA FLJ57670, highly similar to Endoglin
<i>B4DR27</i>	cDNA FLJ58607, highly similar to Zinc finger protein basonuclin-2
<i>B4DYG7</i>	cDNA FLJ58647, highly similar to Signal-induced proliferation-associated 1-like protein 1
<i>B7Z4I5</i>	cDNA FLJ58675, highly similar to Band 4.1-like protein 3
<i>B4DEF2</i>	cDNA FLJ59851, highly similar to DNA methyltransferase 1-associated protein 1
<i>B2RDX7</i>	cDNA, FLJ96814, highly similar to Homo sapiens CCR4-NOT transcription complex, subunit 2 (CNOT2), mRNA
<i>Q9P209</i>	Centrosomal protein of 72 kDa
<i>Q6P5Z9</i>	CLIP1 protein (Fragment)
<i>P02452</i>	Collagen alpha-1(I) chain
<i>Q8TD11</i>	Decay-accelerating factor 4ab (Fragment)
<i>A2A370</i>	Dedicator of cytokinesis protein 8
<i>G3V1B5</i>	Down syndrome cell adhesion molecule like 1, isoform CRA_a
<i>F8W9J4</i>	Dystonin
<i>E7EMW7</i>	E3 ubiquitin-protein ligase UBR5
<i>Q5CZC0</i>	Fibrous sheath-interacting protein 2
<i>D3DX93</i>	HCG1745555, isoform CRA_b
<i>Q9NR48</i>	Histone-lysine N-methyltransferase ASH1L
<i>P04264</i>	Keratin, type II cytoskeletal 1
<i>Q9NQT8</i>	Kinesin-like protein KIF13B
<i>Q9P2V4</i>	Leucine-rich repeat, immunoglobulin-like domain and transmembrane domain-containing protein 1
<i>F8WD26</i>	LIM domain only protein 7
<i>Q9NR99</i>	Matrix-remodeling-associated protein 5
<i>E7ERL6</i>	Microtubule-associated serine/threonine-protein kinase 2
<i>O43283</i>	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 13
<i>Q9BX99</i>	Mutant early onset breast cancer susceptibility protein 2 (Fragment)
<i>A7E2D6</i>	NAV2 protein
<i>Q14918</i>	Nebulin (Fragment)
<i>F8W8T3</i>	Obscurin

Dentina ácido láctico 2 horas	<i>Q9UKJ0</i>	Paired immunoglobulin-like type 2 receptor beta
	<i>H3BQM0</i>	PAP-associated domain-containing protein 5
	<i>Q9NTG1</i>	Polycystic kidney disease and receptor for egg jelly-related protein
	<i>C0JYZ2</i>	Probable ATP-dependent RNA helicase YTHDC2
	<i>Q08AI6</i>	Putative sodium-coupled neutral amino acid transporter 11
	<i>Q6M1B8</i>	Putative uncharacterized protein DKFZp686J06106
	<i>Q8N1G1</i>	RNA exonuclease 1 homolog
	<i>Q8IWY4</i>	Signal peptide, CUB and EGF-like domain-containing protein 1
	<i>A7MD96</i>	SYNPO protein (Fragment)
	<i>Q5UIP0</i>	Telomere-associated protein RIF1
	<i>F5H2D1</i>	Teneurin-2
	<i>Q9H2D6</i>	TRIO and F-actin-binding protein
	<i>A6NCA8</i>	Ubiquitin-associated protein 2
	<i>H7C2C1</i>	Uncharacterized protein
	<i>Q504W3</i>	Uncharacterized protein - Fragment
	<i>H0Y781</i>	Uncharacterized protein KIAA1109 (Fragment)
	<i>Q8IUG5</i>	Unconventional myosin-XVIIIb
	<i>C9JVC3</i>	Zinc finger protein 717
	<i>A6NM28</i>	Zinc finger protein 92 homolog
	<i>Q86SH2</i>	Zygote arrest protein 1
	Nº de acesso	Descrição
	<i>B4DZC3</i>	5'-3' exoribonuclease 2
	<i>Q8TAX5</i>	AFF4 protein
	<i>Q12955</i>	Ankyrin-3
	<i>F8VVT9</i>	Arf-GAP with GTPase, ANK repeat and PH domain-containing protein 2
	<i>Q9ULK2</i>	Ataxin-7-like protein 1
	<i>Q9H986</i>	cDNA FLJ12923 fis, clone NT2RP2004681, weakly similar to NEUROFILAMENT TRIPLET H PROTEIN
	<i>Q96K89</i>	cDNA FLJ14438 fis, clone HEMBB1000317, weakly similar to FIBULIN-1, ISOFORM D
	<i>B4E223</i>	cDNA FLJ52075, moderately similar to Mus musculus SPT2, Suppressor of Ty, domain containing 1, mRNA
	<i>B4DKU3</i>	cDNA FLJ53449, highly similar to rRNA methyltransferase 3 (EC 2.1.1.-)
	<i>B4DSJ6</i>	cDNA FLJ54510, highly similar to Adenylate cyclase type 2 (EC 4.6.1.1)
	<i>A8K5X9</i>	cDNA FLJ77989, highly similar to Homo sapiens RNA binding motif protein 19, mRNA
	<i>Q8IYE1</i>	Coiled-coil domain-containing protein 13
	<i>B2RNN3</i>	Complement C1q and tumor necrosis factor-related protein 9B
	<i>P32926</i>	Desmoglein-3
	<i>O60469</i>	Down syndrome cell adhesion molecule
	<i>P02675</i>	Fibrinogen beta chain
	<i>Q6NWM5</i>	G protein-coupled receptor 21

**Dentina água deionizada
10 minutos**

<i>Q5DT20</i>	Hornerin
<i>P11215</i>	Integrin alpha-M
<i>Q96T58</i>	Msx2-interacting protein
<i>Q7Z5W2</i>	MYT1 protein (Fragment)
<i>F5H6D8</i>	N6-adenosine-methyltransferase 70 kDa subunit
<i>P43146</i>	Netrin receptor DCC
<i>P21359</i>	Neurofibromin
<i>Q5VV67</i>	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-related protein 1
<i>F5GX16</i>	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate 5-phosphatase 1
<i>O75592</i>	Probable E3 ubiquitin-protein ligase MYCBP2
<i>Q96RK0</i>	Protein capicua homolog
<i>E9PQY0</i>	Protein FAM220A - fragment
<i>Q49AI5</i>	REV1 protein
<i>Q9NRC6</i>	Spectrin beta chain, non-erythrocytic 5
<i>Q5TAX3</i>	Terminal uridylyltransferase 4
<i>Q8WZ42</i>	Titin
<i>B7WPF4</i>	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase
<i>F8W7G7</i>	Ugl-Y3
<i>Q2LD37</i>	Uncharacterized protein KIAA1109
Nº de acesso	Descrição
<i>P58397</i>	A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 12
<i>Q9UHB7</i>	AF4/FMR2 family member 4
<i>Q9NS89</i>	Alpha1A-voltage-dependent calcium channel (Fragment)
<i>O15265</i>	Ataxin-7
<i>A1YBP1</i>	Breast and ovarian cancer susceptibility protein 2 truncated variant
<i>Q9UIF8</i>	Bromodomain adjacent to zinc finger domain protein 2B
<i>Q8IZJ3</i>	C3 and PZP-like alpha-2-macroglobulin domain-containing protein 8
<i>P07339</i>	Cathepsin D
<i>B7Z526</i>	cDNA FLJ59292, highly similar to Homo sapiens neuron navigator 2 (NAV2), transcript variant 2, mRNA (Fragment)
<i>Q96MF4</i>	Coiled-coil domain-containing protein 140
<i>B3KNQ0</i>	Coiled-coil domain-containing protein 92
<i>Q6LAN8</i>	Collagen type I alpha 1 (Fragment)
<i>Q20BI7</i>	CTTNBP2
<i>Q08495</i>	Dematin
<i>Q96JH7</i>	Deubiquitinating protein VCIP135
<i>Q8TB52</i>	F-box only protein 30
<i>Q0JRZ9</i>	FCH domain only protein 2
<i>Q53EP0</i>	Fibronectin type III domain-containing protein 3B
<i>Q59F85</i>	Glucose phosphate isomerase variant (Fragment)
<i>H0YAF8</i>	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1 (Fragment)
<i>G3V1J7</i>	HCG2043693

	C9J3N8	Heat shock protein beta-1
	P02533	Keratin, type I cytoskeletal 14
	O60299	Leucine zipper putative tumor suppressor 3
	Q7LBC6	Lysine-specific demethylase 3B
	E7EWQ5	Microtubule-associated serine/threonine-protein kinase 4
	E2RYF6	Mucin-22
	B1W6B2	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 5
	A4GYN5	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 5
	H0YHA8	Neuron navigator 3 (Fragment)
	O60346	PH domain leucine-rich repeat-containing protein phosphatase 1
	Q6IQ23	Pleckstrin homology domain-containing family A member 7
	Q15149	Plectin
	D6RAQ3	Prelamin-A/C
	Q8IZF6	Probable G-protein coupled receptor 112
	E7EPW6	Programmed cell death protein 6
	Q8IVF2	Protein AHNK2
	Q6P1L5	Protein FAM117B
	Q59H55	Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 13 isoform 2 variant (Fragment)
	Q5H9S0	Putative uncharacterized protein DKFZp781N1974
	B3W6H7	Putative uncharacterized protein TET1-MLL (Fragment)
	Q2M1Z3	Rho GTPase-activating protein 31
	O15085	Rho guanine nucleotide exchange factor 11
	Q9Y3L3	SH3 domain-binding protein 1
	Q6S5L8	SHC-transforming protein 4
	A4D1A8	Similar to Piccolo protein (Aczonin)
	A4D236	Similar to polycystic kidney disease 1-like 3
	F5H376	SRC kinase-signaling inhibitor 1
	Q9P2P6	StAR-related lipid transfer protein 9
	Q8IY92	Structure-specific endonuclease subunit SLX4
	P31629	Transcription factor HIVP2
	H3BTF6	Uncharacterized protein C16orf59 (Fragment)
	Q9UF83	Uncharacterized protein DKFZp434B061
Dentina água deionizada 2 horas	Nº de acesso	Descrição
	Q8TE57	A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 16
	Q9UKA4	A-kinase anchor protein 11
	Q86UK0	ATP-binding cassette sub-family A member 12
	B3KWI5	cDNA FLJ43124 fis, clone CTONG3004072, highly similar to Protein EMSY
	B4DTI2	cDNA FLJ50211, highly similar to Collagen alpha-1(XVII) chain
	B4E2I9	cDNA FLJ55486, highly similar to Semaphorin-3C
	B4DEF9	cDNA FLJ59241, highly similar to Transducin-like enhancer protein 1
	B7Z727	cDNA FLJ61605, highly similar to Homo sapiens DALR anticodon binding domain containing 3

	(DALRD3), transcript variant 1, mRNA
<i>A8K6N7</i>	cDNA FLJ78671
<i>B2RDJ7</i>	cDNA, FLJ96642, highly similar to Homo sapiens gephyrin (GPHN), mRNA
<i>G3V3F4</i>	Centrosomal protein of 128 kDa (Fragment)
<i>P08218</i>	Chymotrypsin-like elastase family member 2B
<i>Q86T13</i>	C-type lectin domain family 14 member A
<i>Q9NXL9</i>	DNA helicase MCM9
<i>G5E9L9</i>	Doublecortin and CaM kinase-like 2, isoform CRA_c
<i>B4DX66</i>	Epidermal growth factor receptor kinase substrate 8
<i>B9EK47</i>	HEAT repeat containing 5B
<i>Q96RW7</i>	Hemicentin-1
<i>H0Y765</i>	Histone-lysine N-methyltransferase MLL3 (Fragment)
<i>Q5JU85</i>	IQ motif and SEC7 domain-containing protein 2
<i>Q2M2I5</i>	Keratin, type I cytoskeletal 24
<i>E9PRX9</i>	Kin of IRRE-like protein 3
<i>P11137</i>	Microtubule-associated protein 2
<i>Q02505</i>	Mucin-3A
<i>P98088</i>	Mucin-5AC (Fragments)
<i>B9EGI2</i>	Myosin phosphatase Rho interacting protein
<i>Q12830</i>	Nucleosome-remodeling factor subunit BPTF
<i>Q8TAK6</i>	Oligodendrocyte transcription factor 1
<i>B7ZM65</i>	PHRF1 protein
<i>Q5VWN6</i>	Protein FAM208B
<i>Q9Y6V0</i>	Protein piccolo
<i>A4CZ08</i>	Putative uncharacterized protein DKFZp727A051 (Fragment)
<i>F6KSS9</i>	RAD21L
<i>Q5T6P1</i>	SLAIN motif family, member 1 (Fragment)
<i>Q8TBP0</i>	TBC1 domain family member 16
<i>Q5T2D2</i>	Trem-like transcript 2 protein
<i>Q6UXI7</i>	Vitrin
<i>H7C022</i>	WD repeat-containing protein 60 (Fragment)
<i>Q9ULM3</i>	YEATS domain-containing protein 2

Neste estudo, as proteínas identificadas foram classificadas de acordo com sua função, interações moleculares e origem, seguindo o UNIPROT e os trabalhos de RISON et al. (2000) e ZIMMERMAN et al., (2013). As tabelas 15 e 16 mostram esta classificação detalhada para cada proteína identificada a partir do esmalte e da dentina, respectivamente. Observou-se que, algumas das proteínas identificadas apresentam mais de uma função, origem e interação.

Tabela 15. Classificação das proteínas identificadas a partir da película adquirida formada *in situ* sobre o esmalte por 10 minutos ou 2 horas, seguido por tratamento com ácido cítrico 1% pH 2,5, ácido láctico 0,1 M pH 4,8 ou água deionizada por 20 segundos.

Nº de acesso	Descrição	Cítrico		Lático		Água	
		10 min	2 h	10 min	2 h	10 min	2 h
Q8IU7	ALB protein ^(c, h, n, r, s, w)	Sim	-	Sim	-	-	-
B4DWU6	cDNA FLJ51361, highly similar to Keratin, type II cytoskeletal 6A ^(d, j, n, s)	-	Sim	-	-	-	-
B4DRW1	cDNA FLJ55805, highly similar to Keratin, type II cytoskeletal 4 ^(d, m, n, s)	-	Sim	-	-	-	-
B4DRS2	cDNA FLJ58275, highly similar to Keratin, type II cytoskeletal 4 ^(d, m, n, s)	Sim	-	-	-	-	-
P08123	Collagen alpha-2(I) chain ^(b, d, h, n, o, r, s)	-	Sim	-	-	-	-
H6VRF8	Keratin 1 ^(d, j, n, r, u)	Sim	Sim	Sim	-	Sim	-
P13645	Keratin, type I cytoskeletal 10 ^(b, d, g, o, s)	Sim	-	-	-	-	-
P35527	Keratin, type I cytoskeletal 9 ^(d, j, q, s)	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
P04264	Keratin, type II cytoskeletal 1 ^(b, j, l, n, s)	Sim	Sim	Sim	-	Sim	-
P35908	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal ^(d, g, h, n, s)	Sim	Sim	Sim	-	Sim	-
P02538	Keratin, type II cytoskeletal 6A ^(d, j, n, s)	-	Sim	-	-	-	-
P02768	Serum albumin ^(a, b, c, h, l, n, o, r, s, w)	Sim	-	Sim	-	-	-
Q9P275	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 36 ^(e, i, q, r, s)	Sim	-	-	-	-	-

A classificação pela foi feita segundo a função (Rison et al., 2000) :a) metabolismo; b) processos celulares; c) transporte; d) estrutura e organização estrutural; e) vias de informação; f) miscelânea. Em adição, foi feita classificação seguindo o UNIPROT e o trabalho de Zimmerman et al. (2013), de acordo com a origem: g) citoplasma; h) extracelular; i) núcleo; j) citoesqueleto; k) intracelular; l) Membrana; m) Origem desconhecida; e interação: n) proteína/proteína; o) cálcio/fosfato; p) outras interações moleculares; q) interação molecular desconhecida; e segundo a função na película adquirida, seguindo o trabalho de Zimmerman et al. (2013): r) metabolismo; s) regeneração de tecidos; t) antimicrobiana; u) resposta Imune; v) lubrificação; w) biomineralização; x) função desconhecida.

Tabela 16. Classificação das proteínas identificadas a partir da película adquirida formada *in situ* sobre a dentina por 10 minutos ou 2 horas, seguido por tratamento com ácido cítrico 1% pH 2,5, ácido láctico 0,1 M pH 4,8 ou água deionizada por 20 segundos.

Nº de acesso	Descrição	Cítrico		Lático		Água	
		10 min	2 h	10 min	2 h	10 min	2h
B4DZC3	5'-3' exoribonuclease 2 ^(a, e, i, n, x)	-	-	-	Sim	-	-
P58397	A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 12 ^(c, h, n, x)	-	-	-	-	Sim	-
Q8TE57	A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 16 ^(c, h, n, x)	-	-	-	-	-	Sim
Q13085	Acetyl-CoA carboxylase 1 ^(a, g, n, r)	-	-	Sim	-	-	-
Q9UHB7	AF4/FMR2 family member 4 ^(e, i, n, x)	-	-	-	-	Sim	-
Q8TAX5	AFF4 protein ^(f, m, q, x)	-	-	-	Sim	-	-
Q9UKA4	A-kinase anchor protein 11 ^(c, g, j, n, x)	-	-	-	-	-	Sim
Q9NS89	Alpha1A-voltage-dependent calcium channel (Fragment) ^(b, c, l, o, r, s, u, w)	-	-	-	-	Sim	-
Q8N957	Ankyrin repeat and fibronectin type-III domain-containing protein 1 ^(f, m, q, x)	-	-	Sim	-	-	-
Q12955	Ankyrin-3 ^(b, c, g, j, l, n, x)	-	-	-	Sim	-	-
F8VVT9	Arf-GAP with GTPase, ANK repeat and PH domain-containing protein 2 ^(b, c, e, i, n, x)	-	-	-	Sim	-	-
E5RHJ2	Aspartyl/asparaginyl beta-hydroxylase ^(f, l, q, x)	-	Sim	-	-	-	-
O15265	Ataxin-7 ^(b, e, g, i, j, x)	-	-	-	-	Sim	-
Q9ULK2	Ataxin-7-like protein 1 ^(f, m, q, x)	-	-	-	Sim	-	-
Q86UK0	ATP-binding cassette sub-family A member 12 ^(a, c, l, n, x)	-	-	-	-	-	Sim
A1YBP1	Breast and ovarian cancer susceptibility protein 2 truncated variant ^(e, l, p, r)	-	-	-	-	Sim	-
F8VU39	Bromodomain adjacent to zinc finger domain protein 2A ^(e, l, q, x)	-	-	Sim	-	-	-
Q9UIF8	Bromodomain adjacent to zinc finger domain protein 2B ^(e, l, n, x)	-	-	-	-	Sim	-
Q8IZJ3	C3 and PZP-like alpha-2-macroglobulin domain-containing protein 8 ^(d, h, l, x)	-	-	-	-	Sim	-
Q2F3K1	Calcium sensing receptor (Fragment) ^(b, l, o, r, s, u, w)	-	-	Sim	-	-	-
P07339	Cathepsin D ^(b, h, n, r)	-	-	-	-	Sim	-
F8VVY1	CCR4-NOT transcription complex subunit 2 (Fragment) ^(f, m, q, x)	-	-	Sim	-	-	-
Q9H986	cDNA FLJ12923 fis, clone NT2RP2004681, weakly similar to NEUROFILAMENT TRIPLET H PROTEIN ^(f, m, q, x)	-	-	-	Sim	-	-
Q9H834	cDNA FLJ13966 fis, clone Y79AA1001394, weakly similar to CELL DIVISION PROTEIN FTSH HOMOLOG (EC 3.4.24.-) ^(b, m, n, x)	Sim	-	-	-	-	-
Q96K89	cDNA FLJ14438 fis, clone HEMBB1000317, weakly similar to FIBULIN-1, ISOFORM D ^(c, l, o, x)	-	-	-	Sim	-	-
Q8TCH5	CDNA FLJ23893 fis, clone LNG14589 ^(f, m, q, x)	-	-	Sim	Sim	-	-

B3KNQ8	cDNA FLJ30174 fis, clone BRACE2000975, highly similar to Sodium/potassium-transporting ATPase alpha-3 chain (EC 3.6.3.9) ^(c, l, n, r)	-	-	Sim	-	-	-
B3KWI5	cDNA FLJ43124 fis, clone CTONG3004072, highly similar to Protein EMSY ^(f, m, q, x)	-	-		-	-	Sim
B3KXP1	cDNA FLJ45802 fis, clone NT2RI3001967, highly similar to Ankyrin repeat and SAM domain-containing protein 6 ^(f, m, q, x)	-	-	Sim	-	-	-
B4DTI2	cDNA FLJ50211, highly similar to Collagen alpha-1(XVII) chain ^(d, m, q, r, s)	-	-	-	-	-	Sim
B4E223	cDNA FLJ52075, moderately similar to Mus musculus SPT2, Suppressor of Ty, domain containing 1, mRNA ^(f, m, q, x)	-	-	-	Sim	-	-
B4DL87	cDNA FLJ52243, highly similar to Heat-shock protein beta-1 ^(f, m, n, r)	-	-	Sim	-	-	-
B7Z5K0	cDNA FLJ52445, highly similar to Homo sapiens membrane-associated ring finger (C3HC4) 7 (MARCH7), mRNA ^(c, m, q, r)	-	-	Sim	-	-	-
B4DKU3	cDNA FLJ53449, highly similar to rRNA methyltransferase 3 ^(e, i, q, x)	-	-	-	Sim	-	-
B4DII4	cDNA FLJ53493, highly similar to HEF-like protein ^(b, l, q, x)	-	-	Sim	-	-	-
B4DSJ6	cDNA FLJ54510, highly similar to Adenylate cyclase type 2 (EC 4.6.1.1) ^(b, l, p, x)	-	-	-	Sim	-	-
B4E2I9	cDNA FLJ55486, highly similar to Semaphorin-3C ^(d, l, q, x)	-	-	-	-	-	Sim
B7Z809	cDNA FLJ56016, highly similar to C-1-tetrahydrofolate synthase, cytoplasmic ^(b, m, q, x)	-	-	Sim	-	-	-
B7Z8W9	cDNA FLJ56525, highly similar to Disks large-associated protein 1 ^(b, m, q, x)	-	-	Sim	-	-	-
B4DYI8	cDNA FLJ57670, highly similar to Endoglin ^(f, m, q, x)	-	-	Sim	-	-	-
B4DR27	cDNA FLJ58607, highly similar to Zinc finger protein basonuclin-2 ^(f, m, q, x)	-	-	Sim	-	-	-
B4DYX7	cDNA FLJ58647, highly similar to Signal-induced proliferation-associated 1-like protein 1 ^(b, m, q, x)	-	-	Sim	-	-	-
B7Z4I5	cDNA FLJ58675, highly similar to Band 4.1-like protein 3 ^(d, g, j, l, q, x)	-	-	Sim	-	-	-
B4DEF9	cDNA FLJ59241, highly similar to Transducin-like enhancer protein 1 ^(e, i, q, x)	-	-		-	-	Sim
B7Z526	cDNA FLJ59292, highly similar to Homo sapiens neuron navigator 2 (NAV2), transcript variant 2, mRNA (Fragment) ^(f, m, q, x)	-	-	-	-	Sim	-
B4DEF2	cDNA FLJ59851, highly similar to DNA methyltransferase 1-associated protein 1 ^(e, m, q, x)	-	-	Sim	-	-	-
B7Z727	cDNA FLJ61605, highly similar to Homo sapiens DALR anticodon binding domain containing 3 (DALRD3), transcript variant 1, mRNA ^(f, m, q, x)	-	-	-	-	-	Sim

A8K670	cDNA FLJ75703, highly similar to Homo sapiens nitric oxide synthase interacting protein (NOSIP), mRNA ^(f, m, q, x)	-	Sim	-	-	-	-
A8K5X9	cDNA FLJ77989, highly similar to Homo sapiens RNA binding motif protein 19, mRNA ^(c, e, i, n, x)	-	-	-	Sim	-	-
A8K6N7	cDNA FLJ78671 ^(f, m, q, x)	-	-	-	-	-	Sim
B2RDJ7	cDNA, FLJ96642, highly similar to Homo sapiens gephyrin (GPHN), mRNA ^(a, m, q, x)	-	-	-	-	-	Sim
B2RDX7	cDNA, FLJ96814, highly similar to Homo sapiens CCR4-NOT transcription complex, subunit 2 (CNOT2), mRNA ^(e, i, q, x)	-	-	Sim	-	-	-
G3V3F4	Centrosomal protein of 128 kDa (Fragment) ^(f, m, q, x)	-	-	-	-	-	Sim
Q9P209	Centrosomal protein of 72 kDa ^(b, g, j, n, x)	-	-	Sim	-	-	-
P08218	Chymotrypsin-like elastase family member 2B ^(a, h, q, r)	-	-	-	-	-	Sim
Q6P5Z9	CLIP1 protein (Fragment) ^(f, m, q, x)	-	-	Sim	-	-	-
Q8IYE1	Coiled-coil domain-containing protein 13 ^(f, m, q, x)	-	-	-	Sim	-	-
Q96MF4	Coiled-coil domain-containing protein 140 ^(f, m, q, x)	-	-	-	-	Sim	-
B3KNQ0	Coiled-coil domain-containing protein 92 ^(f, m, q, x)	-	-	-	-	Sim	-
P02452	Collagen alpha-1(I) chain ^(b, c, d, e, h, n, o, r, s)	-	-	Sim	-	-	-
P08123	Collagen alpha-2(I) chain ^(b, c, d, h, n, o, r, s)	Sim	-	Sim	Sim	Sim	Sim
Q6LAN8	Collagen type I alpha 1 (Fragment) ^(b, c, d, h, g, n, r, s)	-	-	-	-	Sim	-
D3DTX7	Collagen, type I, alpha 1, isoform CRA_a ^(d, h, n, r, s)	Sim	-	Sim	Sim	Sim	Sim
B2RNN3	Complement C1q and tumor necrosis factor-related protein 9B ^(d, m, n, r, u)	-	-	-	Sim	-	-
Q20BI7	CTTNBP2 ^(f, m, q, x)	-	-	-	-	Sim	-
Q86T13	C-type lectin domain family 14 member A ^(c, l, p, x)	-	-	-	-	-	Sim
Q8TD11	Decay-accelerating factor 4ab (Fragment) ^(f, m, q, x)	-	-	Sim	-	-	-
A2A370	Dedicator of cytokinesis protein 8 ^(b, c, m, n, u)	-	-	Sim	-	-	-
Q08495	Dematin ^(b, d, g, i, j, l, x)	-	-	-	-	Sim	-
P32926	Desmoglein-3 ^(b, l, n, o, x)	-	-	-	Sim	-	-
Q96JH7	Deubiquitinating protein VCIP135 ^(b, g, n, r)	-	-	-	-	Sim	-
Q9NXL9	DNA helicase MCM9 ^(e, i, n, x)	-	-	-	-	-	Sim
G5E9L9	Doublecortin and CaM kinase-like 2, isoform CRA_c ^(b, m, n, x)	-	-	-	-	-	Sim
O60469	Down syndrome cell adhesion molecule ^(b, h, l, n, x)	-	-	-	Sim	-	-
G3V1B5	Down syndrome cell adhesion molecule like 1, isoform CRA_a ^(f, m, q, x)	-	-	Sim	-	-	-
Q6DEN2	DPYSL3 protein ^(b, c, g, p, x)	Sim	-	-	-	-	Sim
F8W9J4	Dystonin ^(b, g, i, j, o, x)	-	-	Sim	-	-	-
E7EMW7	E3 ubiquitin-protein ligase UBR5 ^(b, k, n, r, s)	-	-	Sim	-	-	-

B4DX66	Epidermal growth factor receptor kinase substrate 8 (d, m, n, r)	-	-	-	-	-	Sim
Q8TB52	F-box only protein 30 (c, m, q, x)	-	-	-	-	Sim	-
Q0JRZ9	FCH domain only protein 2 (a, b, l, p, x)	-	-	-	-	Sim	-
P02675	Fibrinogen beta chain (b, c, m, n, o, x)	-	-	-	Sim	-	-
P08F94	Fibrocystin (b, g, j, l, p, x)	Sim	-	-	-	-	-
Q53EP0	Fibronectin type III domain-containing protein 3B (a, l, q, x)	-	-	-	-	Sim	-
Q5CZC0	Fibrous sheath-interacting protein 2 (f, m, q, x)	-	-	Sim	-	-	-
Q6NWM5	G protein-coupled receptor 21 (b, l, p, x)	-	-	-	Sim	-	-
Q59F85	Glucose phosphate isomerase variant (Fragment) (a, m, n, x)	-	-	-	-	Sim	-
H0YAF8	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1 (Fragment) (a, m, n, s)	-	-	-	-	Sim	-
D3DX93	HCG1745555, isoform CRA_b (f, m, q, x)	-	-	Sim	-	-	-
G3V1J7	HCG2043693 (f, m, q, x)	-	-	-	-	Sim	-
B9EK47	HEAT repeat containing 5B (f, m, q, x)	-	-	-	-	-	Sim
C9J3N8	Heat shock protein beta-1 (a, b, i, l, n, r)	-	-	-	-	Sim	-
Q96RW7	Hemicentin-1 (b, h, l, o, x)	-	-	-	-	-	Sim
Q03164	Histone-lysine N-methyltransferase 2 (a, e, i, n, s)	-	-	Sim	-	Sim	-
Q9NR48	Histone-lysine N-methyltransferase ASH1L (e, i, n, s)	-	-	Sim	-	-	-
H0Y765	Histone-lysine N-methyltransferase MLL3 (Fragment) (c, i, q, s)	-	-	-	-	-	Sim
Q5DT20	Hornerin (c, m, o, x)	-	-	-	Sim	-	-
P01876	Ig alpha-1 chain C region (b, h, n, t, u)	Sim	-	-	-	-	-
P11215	Integrin alpha-M (b, c, i, l, o, x)	-	-	-	Sim	-	-
Q5JU85	IQ motif and SEC7 domain-containing protein 2 (b, d, g, i, n, x)	-	-	-	-	-	Sim
H6VRF8	Keratin 1 (d, j, n, r, u)	-	-	Sim	Sim	-	-
H6VRF9	Keratin 1 (d, j, n, r, u)	Sim	-	-	-	-	-
P13646	Keratin, type I cytoskeletal 13 (d, h, n, s)	-	-	Sim	Sim	Sim	-
P02533	Keratin, type I cytoskeletal 14 (d, g, i, n, s)	-	-	-	-	Sim	-
Q2M2I5	Keratin, type I cytoskeletal 24 (d, g, j, n, s)	-	-	-	-	-	Sim
P35527	Keratin, type I cytoskeletal 9 (d, j, n, s)	-	-	Sim	Sim	-	Sim
P04264	Keratin, type II cytoskeletal 1 (b, j, l, n, s)	-	-	Sim	-	-	-
P35908	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal (b, j, n, s)	-	-	Sim	-	Sim	-
O60382	KIAA0324 (Fragment) (f, m, q, x)	Sim	-	-	-	-	-
E9PRX9	Kin of IRRE-like protein 3 (f, l, q, x)	-	-	-	-	-	Sim
Q9NQT8	Kinesin-like protein KIF13B (b, g, j, n, x)	-	-	Sim	-	-	-
O60299	Leucine zipper putative tumor suppressor 3 (f, g, j, l, q, x)	-	-	-	-	Sim	-
Q9P2V4	Leucine-rich repeat, immunoglobulin-like domain and transmembrane domain-containing protein 1 (f, l, q, x)	-	-	Sim	-	-	-
F8WD26	LIM domain only protein 7 (f, m, q, x)	-	-	Sim	-	-	-
Q7LBC6	Lysine-specific demethylase 3B (e, i, q, x)	-	-	-	-	Sim	-
Q9NR99	Matrix-remodeling-associated protein 5 (f, h, q, x)	-	-	Sim	-	-	-
P11137	Microtubule-associated protein 2 (d, g, j, p, w)	Sim	-	-	-	-	Sim
E7ERL6	Microtubule-associated serine/threonine-protein kinase 2 (c, g, n, x)	-	-	Sim	-	-	-

O60307	Microtubule-associated serine/threonine-protein kinase 3 ^(c, g, n, x)	-	Sim	-	-	-	-
E7EWQ5	Microtubule-associated serine/threonine-protein kinase 4 ^(c, g, n, x)	-	-	-	-	Sim	-
O43283	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 13 ^(a, b, g, l, n, x)	-	-	Sim	-	-	-
Q96T58	Msx2-interacting protein ^(e, i, n, x)	-	-	-	Sim	-	-
G3CIG0	MUC19 variant 12 ^(f, h, q, v)	Sim	-	Sim	Sim	Sim	Sim
B5ME49	Mucin-16 ^(f, m, q, v)	Sim	-	Sim	Sim	-	Sim
Q8WXI7	Mucin-16 ^(b, l, n, v)	-	-	Sim	-	Sim	-
E7EPM4	Mucin-17 ^(f, m, n, v)	Sim	-	-	-	Sim	-
Q7Z5P9	Mucin-19 ^(b, h, n, v)	-	-	-	Sim	-	Sim
E2RYF6	Mucin-22 ^(f, l, n, v)	-	-	-	-	Sim	-
Q02505	Mucin-3A ^(a, b, h, l, n, v)	-	-	-	-	-	Sim
P98088	Mucin-5AC (Fragments) ^(b, d, h, s, t, v, w)	-	-	-	-	-	Sim
Q9HC84	Mucin-5B ^(b, h, n, v)	-	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
Q9BX99	Mutant early onset breast cancer susceptibility protein 2 (Fragment) ^(f, m, q, u)	-	-	Sim	-	-	-
B9EGI2	Myosin phosphatase Rho interacting protein ^(a, l, n, x)	-	-	-	-	-	Sim
Q7Z5W2	MYT1 protein (Fragment) ^(e, i, n, x)	-	-	-	Sim	-	-
F5H6D8	N6-adenosine-methyltransferase 70 kDa subunit ^(e, i, q, x)	-	-	-	Sim	-	-
B1W6B2	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 5 ^(c, l, n, s)	-	-	-	-	Sim	-
A4GYN5	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 5 ^(c, l, n, s)	-	-	-	-	Sim	-
E9PAV3	Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha ^(f, m, q, x)	-	-	-	Sim	Sim	Sim
A7E2D6	NAV2 protein ^(a, m, n, x)	-	-	Sim	-	-	-
Q14918	Nebulin (Fragment) ^(f, m, q, x)	-	-	Sim	-	-	-
P43146	Netrin receptor DCC ^(a, b, l, p, x)	-	-	-	Sim	-	-
P21359	Neurofibromin ^(a, b, d, g, i, l, n, x)	-	-	-	Sim	-	-
E7EUA9	Neuron navigator 3 ^(e, m, p, x)	Sim	-	-	-	-	-
H0YHA8	Neuron navigator 3 (Fragment) ^(e, m, p, x)	-	-	-	-	Sim	-
Q12830	Nucleosome-remodeling factor subunit BPTF ^(b, e, g, i, n, x)	-	-	-	-	-	Sim
F8W8T3	Obscurin ^(b, k, p, x)	-	-	Sim	-	-	-
Q8TAK6	Oligodendrocyte transcription factor 1 ^(e, i, p, x)	-	-	-	-	-	Sim
Q9UKJ0	Paired immunoglobulin-like type 2 receptor beta ^(b, l, q, x)	-	-	Sim	-	-	-
H3BQM0	PAP-associated domain-containing protein 5 ^(a, c, m, q, x)	-	-	Sim	-	-	-
Q96Q06	Perilipin-4 ^(a, g, l, x)	-	-	Sim	Sim	-	-
Q5VV67	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-related protein 1 ^(e, i, p, x)	-	-	-	Sim	-	-
O60346	PH domain leucine-rich repeat-containing protein phosphatase 1 ^(a, b, g, l, o, x)	-	-	-	-	Sim	-
F5GXI6	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate 5-phosphatase 1 ^(f, m, q, x)	-	-	-	Sim	-	-
B7ZM65	PHRF1 protein ^(c, m, q, x)	-	-	-	-	-	Sim

Q9H4M7	Pleckstrin homology domain-containing family A member 4 ^(a, g, l, p, x)	Sim	-	Sim	-	-	-
Q6IQ23	Pleckstrin homology domain-containing family A member 7 ^(d, g, i, j, p, x)	-	-	-	-	Sim	-
Q15149	Plectin ^(d, g, j, n, s)	-	-	-	-	Sim	-
Q9NTG1	Polycystic kidney disease and receptor for egg jelly-related protein ^(c, l, o, x)	-	-	Sim	-	-	-
D6RAQ3	Prelamin-A/C ^(d, m, q, x)	-	-	-	-	Sim	-
Q9H6S0	Probable ATP-dependent RNA helicase YTHDC2 ^(c, m, q, x)	-	-	Sim	-	-	-
O75592	Probable E3 ubiquitin-protein ligase MYCBP2 ^(b, e, i, n, r, s)	-	-	-	Sim	-	-
Q8IZF6	Probable G-protein coupled receptor 112 ^(c, l, q, x)	-	-	-	-	Sim	-
E7EPW6	Programmed cell death protein 6 ^(c, m, o, x)	-	-	-	-	Sim	-
Q8IVF2	Protein AHNK2 ^(f, i, o, x)	-	-	-	-	Sim	-
Q96RK0	Protein capicua homolog ^(e, i, n, x)	-	-	-	Sim	-	-
Q6P1L5	Protein FAM117B ^(f, m, q, x)	-	-	-	-	Sim	-
Q5VWN6	Protein FAM208B ^(f, m, q, x)	-	-	-	-	-	Sim
E9PQY0	Protein FAM220A – fragment ^(f, m, q, x)	-	-	-	Sim	-	-
F8VZN8	Protein phosphatase 1 regulatory subunit 12A (Fragment) ^(f, m, q, x)	-	-	-	-	Sim	Sim
Q9Y6V0	Protein piccolo ^(b, d, j, l, o, x)	-	-	-	-	-	Sim
Q9C0D5	Protein TANC1 ^(b, l, n, x)	-	-	-	Sim	-	Sim
Q59H55	Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 13 isoform 2 variant (Fragment) ^(a, j, p, x)	-	-	-	-	Sim	-
Q08AI6	Putative sodium-coupled neutral amino acid transporter 11 ^(c, l, q, x)	-	-	Sim	-	-	-
Q6M1B8	Putative uncharacterized protein DKFZp686J06106 ^(f, m, q, x)	-	-	Sim	-	-	-
A4CZ08	Putative uncharacterized protein DKFZp727A051 (Fragment) ^(b, e, g, i, n, x)	-	-	-	-	-	Sim
Q5H9S0	Putative uncharacterized protein DKFZp781N1974 ^(c, e, i, n, x)	-	-	-	-	Sim	-
B3W6H7	Putative uncharacterized protein TET1-MLL (Fragment) ^(f, m, q, x)	-	-	-	-	Sim	-
F6KSS9	RAD21L ^(a, i, q, x)	-	-	-	-	-	Sim
Q49AI5	REV1 protein ^(e, i, q, x)	-	-	-	Sim	-	-
Q2M1Z3	Rho GTPase-activating protein 31 ^(b, m, n, x)	-	-	-	-	Sim	-
O15085	Rho guanine nucleotide exchange factor 11 ^(b, d, g, l, n, s)	-	-	-	-	Sim	-
Q8N1G1	RNA exonuclease 1 homolog ^(e, i, n, x)	-	-	Sim	-	-	-
O95171	Sciellin ^(a, g, l, p, x)	-	Sim	-	-	-	-
Q9Y3L3	SH3 domain-binding protein 1 ^(b, g, q, x)	-	-	-	-	Sim	-
Q6S5L8	SHC-transforming protein 4 ^(b, l, n, x)	-	-	-	-	Sim	-
Q8IWY4	Signal peptide, CUB and EGF-like domain-containing protein 1 ^(b, h, l, n, o, x)	-	-	Sim	-	-	-
A4D1A8	Similar to Piccolo protein (Aczonin) ^(f, m, q, x)	-	-	-	-	Sim	-
A4D236	Similar to polycystic kidney disease 1-like 3 ^(f, m, q, x)	-	-	-	-	Sim	-
Q5T6P1	SLAIN motif family, member 1 (Fragment) ^(f, m, q, x)	-	-	-	-	-	Sim

Q9NRC6	Spectrin beta chain, non-erythrocytic 5 ^(d, g, j, l, n, x)	-	-	-	Sim	-	-
F5H376	SRC kinase-signaling inhibitor 1 ^(b, m, q, x)	-	-	-	-	Sim	-
Q9P2P6	StAR-related lipid transfer protein 9 ^(b, g, i, j, q, x)	-	-	-	-	Sim	-
Q8IY92	Structure-specific endonuclease subunit SLX4 ^(e, i, n, x)	-	-	-	-	Sim	-
A7MD96	SYNPO protein (Fragment) ^(f, m, q, x)	-	-	Sim	-	-	-
Q9Y4G6	Talin-2 ^(b, d, g, j, l, p, x)	Sim	-	-	-	-	-
Q8TBP0	TBC1 domain family member 16 ^(b, k, n, x)	-	-	-	-	-	Sim
Q5UIP0	Telomere-associated protein RIF1 ^(b, e, g, i, j, q, x)	-	-	Sim	-	-	-
F5H2D1	Teneurin-2 ^(b, l, q, x)	-	-	Sim	-	-	-
Q5TAX3	Terminal uridylyltransferase 4 ^(b, e, g, i, n, x)	-	-	-	Sim	-	-
C0JYZ2	Titin ^(e, i, n, w)	-	Sim	Sim	-	Sim	Sim
Q8WZ42	Titin ^(a, b, c, d, g, h, i, n, o, w)	-	-	-	Sim	-	-
P31629	Transcription factor HIVEP2 ^(e, i, n, x)	-	-	-	-	Sim	-
Q5T2D2	Trem-like transcript 2 protein ^(b, l, p, x)	-	-	-	-	-	Sim
Q9H2D6	TRIO and F-actin-binding protein ^(b, d, g, i, j, n, s)	-	-	Sim	-	-	-
B7WPF4	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase ^(a, m, n, r, s)	-	-	-	Sim	-	-
A6NCA8	Ubiquitin-associated protein 2 ^(f, m, q, r, s)	-	-	Sim	-	-	-
F8W7G7	Ugl-Y3 ^(f, h, q, r, s)	-	-	-	Sim	-	-
H7C2C1	Uncharacterized protein ^(f, m, q, x)	-	-	Sim	-	-	-
Q504W3	Uncharacterized protein – Fragment ^(f, m, q, x)	-	-	Sim	-	-	-
H3BTF6	Uncharacterized protein C16orf59 (Fragment) ^(f, m, q, x)	-	-	-	-	Sim	-
Q9UF83	Uncharacterized protein DKFZp434B061 ^(f, m, q, x)	-	-	-	-	Sim	-
Q9Y2F5	Uncharacterized protein KIAA0947 ^(f, m, q, x)	Sim	-	Sim	Sim	-	Sim
Q2LD37	Uncharacterized protein KIAA1109 ^(b, i, l, q, x)	-	-	-	Sim	-	-
H0Y781	Uncharacterized protein KIAA1109 (Fragment) ^(f, m, q, x)	-	-	Sim	-	-	-
Q8IUG5	Unconventional myosin-XVIIIb ^(a, d, g, i, n, x)	-	-	Sim	-	-	-
Q6UXI7	Vitrin ^(d, h, p, x)	-	-	-	-	-	Sim
H7C022	WD repeat-containing protein 60 (Fragment) ^(f, m, q, x)	-	-	-	-	-	Sim
Q9ULM3	YEATS domain-containing protein 2 ^(e, i, q, x)	-	-	-	-	-	Sim
Q86UP3	Zinc finger homeobox protein 4 ^(e, i, q, x)	-	-	-	Sim	Sim	-
C9JVC3	Zinc finger protein 717 ^(e, k, n, x)	-	-	Sim	-	-	-
A6NM28	Zinc finger protein 92 homolog ^(e, i, n, x)	-	-	Sim	-	-	-
Q86SH2	Zygote arrest protein 1 ^(d, g, q, x)	-	-	Sim	-	-	-

A classificação pela foi feita segundo a função (Rison et al., 2000) :a) metabolismo; b) processos celulares; c) transporte; d) estrutura e organização estrutural; e) vias de informação; f) miscelânea. Em adição, foi feita classificação seguindo o UNIPROT e o trabalho de Zimmerman et al. (2013), de acordo com a origem: g) citoplasma; h) extracelular; i) núcleo; j) citoesqueleto; k) intracelular; l) Membrana; m) Origem desconhecida; e interação: n) proteína/proteína; o) cálcio/fosfato; p) outras interações moleculares; q) interação molecular desconhecida; e segundo a função na película adquirida, seguindo o trabalho de Zimmerman et al. (2013): r) metabolismo; s) regeneração de tecidos; t) antimicrobiana; u) resposta Imune; v) lubrificação; w) biomineralização; x) função desconhecida.

As proteínas identificadas foram classificadas de acordo com seis categorias funcionais: metabolismo (obtenção de energia e degradação de pequenas moléculas e macromoléculas), processos celulares (defesa do organismo e regulação intracelular), transporte (transporte de íons, pequenas moléculas e macromoléculas), estrutura e organização estrutural (citoesqueleto e membrana celular), vias de informação (degradação e síntese de DNA e RNA) e miscelânea (desconhecida) (RISON; HODGMAN; THORNTON, 2000).

Dentre as proteínas identificadas na película formada sobre o esmalte (Figura 8), 6% possuem função metabólica e vias de informação, 12% de transporte, 23% de processos celulares e 53% de estrutura e organização estrutural. Já para a dentina (Figura 9), 10% das proteínas identificadas apresentam função metabólica, 12% de estrutura e organização estrutural, 13% de transporte, 15% vias de informação, 26% estão envolvidas com processos celulares e 24% têm função desconhecida (miscelânea).

Figura 8. Distribuição funcional das proteínas identificadas na película adquirida formada sobre a dentina, baseado em Rison et al. (2000).

Figura 9. Distribuição funcional das proteínas identificadas na película adquirida formada sobre a dentina, baseado em Rison et al. (2000).

As proteínas foram agrupadas de acordo com sua origem, sendo que as buscas foram feitas no UNIPROT (www.uniprot.org), empregando-se o número de acesso. No esmalte (Figura 10), 56% das proteínas identificadas eram de origem extracelular, 31% de origem intracelular e 13% tinham origem desconhecida. Este grande número de proteínas extracelulares são secretadas a partir de glândulas salivares (SIQUEIRA et al., 2008). Diferentemente do esmalte, na dentina (Figura 11), foram identificados 18% de proteínas com origem extracelular, 53% com origem intracelulares e 29 % com origem desconhecida.

Figura 10. Distribuição da origem das proteínas identificadas na película adquirida formada sobre o esmalte.

Figura 11. Distribuição da origem das proteínas identificadas na película adquirida formada sobre a dentina.

A camada da película é de grande importância fisiológica e patofisiológica para todas as interações na superfície da interface entre dente e saliva. A película participa de todos os eventos desta interface, como remineralização, desmineralização, lubrificação das superfícies dentárias e aderência bacteriana (HANNIG, M.; JOINER, 2006). Estas proteínas foram classificadas com base em suas possíveis interações no desenvolvimento da película, sendo divididas em quatro grupos: proteínas que se ligam aos íons cálcio/fosfato, proteínas que demonstram interações com outras proteínas, proteínas que efetuam outras interações moleculares e proteínas com interação desconhecida (ZIMMERMAN et al., 2013).

Dentre as proteínas do esmalte (Figura 12), 67% apresentavam interações proteína/proteína, 20% interações cálcio/fosfato e 13% desconhecida. Já na dentina (Figura 13) esta classificação foi de 39% apresentando interações proteína/proteína, 8% de interações cálcio/fosfato, 11% outras interações moleculares e 42% interação desconhecida. O primeiro nível de formação da película pode ser explicado pela adsorção discreta sobre a superfície dentária, ou seja, as proteínas salivares são primeiramente adsorvidas à superfície dentária devido às interações eletrostáticas da dupla camada iônica - cálcio e fosfato (HANNIG, M.; JOINER, 2006; MORENO; KRESAK; HAY, 1982). O segundo estágio de formação da película é caracterizado pela adsorção de biopolímeros da saliva, sendo que este processo envolve a

interação proteína-proteína, envolvendo proteínas já adsorvidas, imobilizadas na camada da película e proteínas de agregados proteicos da saliva (HANNIG, M.; JOINER, 2006).

Além disso, relata-se que a habilidade dos constituintes lipídicos pode retardar a difusão de ácido láctico através da película, protegendo assim a superfície do esmalte de ácidos (HANNIG, M.; JOINER, 2006; SLOMIANY et al., 1986). Tem-se sugerido a habilidade de fosfolipídios de afetar as propriedades da película, tornando-a mais resistente a ataques ácidos, devido a interações com mucinas (HANNIG, M.; JOINER, 2006; SLOMIANY et al., 1990). Deve ser destacado que várias isoformas de mucinas foram identificadas na película formada sobre a dentina no presente trabalho, sendo que algumas delas foram resistentes à remoção após os desafios ácidos.

Neste estudo apareceram algumas interações moleculares com receptores, para as seguintes proteínas: *Fibrocystin*, *Lysine-specific demethylase 3B* e *Trem-like transcript 2 protein*. As caracterizações de receptores encontrados na película promovem a aderência bacteriana ao dente, podendo interagir com adesinas bacterianas e bloquear sua aderência ao dente (GIBBONS; ETHERDEN, 1983; HANNIG, M.; JOINER, 2006).

Figura 12. Distribuição das interações das proteínas identificadas na película adquirida formada sobre o esmalte.

Figura 13. Distribuição das interações das proteínas identificadas na película adquirida formada sobre a dentina.

As proteínas que compõem a película adquirida do esmalte e da dentina possuem funções importantes que estão ligadas a esta adsorção seletiva, como, metabolismo, regeneração de tecidos, antimicrobiana, resposta imune, lubrificação e biomineralização (ZIMMERMAN et al., 2013). A função de regeneração de tecido está relacionada com diferentes isoformas de queratinas identificadas tanto na película formada sobre o esmalte quanto sobre a dentina. Na dentina foram identificadas, ainda, algumas isoformas de colágeno, também relacionado com regeneração de tecidos e metabolismo. Outras proteínas relacionadas ao metabolismo identificadas na dentina foram *Heat shock protein beta-1* e *Acetyl-CoA carboxylase 1*.

Uma das proteínas identificadas na dentina (*Ig alpha-1 chain C region*) está envolvida com a função antimicrobiana e resposta imune. Estas funções biológicas são fundamentais, pois permitem a defesa do hospedeiro contra agentes patogênicos orais (ZIMMERMAN et al., 2013).

As proteínas envolvidas na função de biomineralização apresentam uma elevada afinidade para os íons cálcio e fosfato e também são importantes na manutenção da homeostase do esmalte (ZIMMERMAN et al., 2013). Dentre elas, no esmalte foi identificada a *Serum albumin* e, para a dentina, *Titin*, *Mucin-5AC* e *Microtubule-associated protein 2*.

A superfície dentária é lubrificada pela película, o que faz com que a fala e a mastigação fiquem mais confortáveis (HANNIG, M.; JOINER, 2006). A principal proteína relacionada com esta função é a mucina, sendo que no presente trabalho várias isoformas de mucinas, muitas delas ácido-resistentes, foram identificadas na película formada sobre a dentina.

Devido à sua constituição predominantemente proteica, o perfil de proteínas de película pode ser empregado como uma ferramenta de diagnóstico, já que ela pode conter biomarcadores salivares de diferentes patologias. Neste sentido, em especial, foi identificada na película formada sobre a dentina a proteína Catepsina D, uma aspartil-protease lisossomal que desempenha papéis importantes relacionados à proteólise em processos fisiológicos, assim como em processos patológicos, estando envolvida em doenças, tais como câncer (considerada como marcador tumoral para o câncer de mama, está relacionada à invasão tumoral), aterosclerose e doença de Alzheimer (MAYNADIER et al., 2013; SUN et al., 2013).

A liberação de Cálcio (Ca) para os meios de imersão foi empregada neste estudo como uma análise complementar à análise proteômica, a fim de se inferir o potencial protetor da película formada sobre esmalte, quando comparada àquela formada sobre a dentina, bem como da película jovem (10 minutos de formação) quando comparada à película madura (2 horas de formação). A Tabela 17 mostra a concentração de Ca liberada a partir dos blocos de esmalte, após exposição à água, ácido cítrico 1% (pH 2,5) e ácido láctico 0,1 M (pH 4,8) por 20 segundos. A análise estatística utilizando o teste ANOVA empregando dois critérios de medidas repetidas demonstrou diferença significativa entre os meios de imersão dos blocos ($F=18,08$, $p<0,0001$), mas não entre os tempos de formação da película ($F=0,007$, $p=0,933$), sendo a interação entre ambos significativa ($F=4,73$, $p=0,020$).

Em relação aos tempos de formação da película, nota-se uma tendência para redução da liberação de Ca quando a película formou-se por 2 horas, quando comparada à película formada por 10 minutos, quando os blocos foram imersos nos ácidos. Entretanto, como mencionado acima, esta diferença não foi significativa. Este resultado já poderia ser esperado, uma vez que a primeira camada de proteínas que se adere ao esmalte parece ser a que confere a maior proteção contra a desmineralização dentária, uma vez que se trata de uma camada bastante eletrônica densa. As camadas subsequentes têm um arranjo muito mais frouxo quando comparado àquela das películas basais (HANNIG, M., 1999). A literatura relata que

não há diferença no potencial protetor contra a desmineralização de películas formadas depois de 3 minutos de exposição à saliva, quando comparadas com aquelas formadas 2 horas após (HANNIG, M. et al., 2004).

Quanto aos diferentes meios de imersão, independentemente do tempo de formação da película, houve uma liberação significativamente maior de Ca quando os blocos foram imersos nos ácidos, em comparação à água, o que já era esperado. Entretanto, a quantidade de Ca liberada por imersão dos blocos nos 2 tipos de ácidos foi semelhante. As concentrações de Ca liberado nos meios de imersão foram cerca de 10 vezes inferiores às aquelas relatadas por Hannig et al. (HANNIG, M. et al., 2004), que imergiram blocos de esmalte recobertos por película com 2 horas de formação em solução de ácido cítrico 1%. Deve ser mencionado que neste caso o tempo de imersão no ácido foi de 1 minuto e tratavam-se de blocos de dentes bovinos, enquanto que no presente estudo foi de 20 segundos e foram utilizados blocos de dentes humanos. Em adição, os blocos de esmalte utilizados no estudo de (HANNIG, M. et al., 2004) foram submetidos a polimento antes da formação da película, uma vez que também tiveram a dureza superficial analisada. Assim, o polimento pode ter interferido com a adesão de proteínas na superfície do bloco de esmalte, alterando a estrutura da película adquirida formada.

Os resultados para a concentração de Ca liberada a partir dos blocos de dentina (Tabela 18) foram similares às aqueles encontrados para os blocos de esmalte. A análise estatística utilizando o teste ANOVA empregando dois critérios de medidas repetidas detectou diferenças significativas entre os meios de imersão dos blocos ($F=38,24$, $p<0,0001$), mas não entre os tempos de formação da película ($F=0,102$, $p=0,752$), sem interação significativa entre ambos ($F=0,429$, $p=0,657$). Como observado para os blocos de esmalte, independentemente do tempo de formação da película, houve uma liberação significativamente maior de Ca quando os blocos foram imersos nos ácidos, em comparação à água. Entretanto, para os blocos de dentina a liberação de Ca mediante exposição ao ácido cítrico 1% foi significativamente maior que aquela observada quando da exposição ao ácido láctico 0,1 M, no tempo de 2 horas de formação da película. Já quando a película foi formada por 10 minutos, não houve diferença significativa entre estes dois tipos de ácidos, como observado para os blocos de esmalte.

Tabela 17. Liberação de cálcio (mg/L por mm²) a partir de blocos de esmalte cobertos por película adquirida formada por 10 minutos ou 2 horas, após exposição a água, ácido cítrico 1%, ácido láctico 0,1 M por 20 segundos.

Tempo de formação da película adquirida	Água^A	Ácido cítrico 1% (pH 2,5)^B	Ácido láctico 0,1 M (pH 4,8)^B
10 minutos	0,18±0,20	2,07±1,10	1,87±0,61
2 horas	0,33±0,25	1,44±0,55	1,34±0,69

Letras distintas nas mesmas linhas indicam diferença significativa entre os meios de imersão dos blocos. Não houve diferença significativa entre os tempos de formação da película adquirida (ANOVA a 2 critérios de medidas repetidas, após transformação logarítmica). n=8.

Tabela 18. Liberação de cálcio (mg/L por mm²) a partir de blocos de dentina cobertos por película adquirida formada por 10 minutos ou 2 horas, após exposição a água, ácido cítrico 1%, ácido láctico 0,1 M por 20 segundos.

Tempo de formação da película adquirida	Água	Ácido cítrico 1% (pH 2,5)	Ácido láctico 0,1 M (pH 4,8)
10 minutos	0,18±0,25 ^A	1,76±0,44 ^B	1,38±0,84 ^B
2 horas	0,22±0,27 ^A	1,82±0,57 ^B	1,16±0,39 ^C

Letras distintas nas mesmas linhas indicam diferença significativa entre os meios de imersão dos blocos. Não houve diferença significativa entre os tempos de formação da película adquirida (ANOVA a 2 critérios de medidas repetidas). n=8.

6 Conclusões

6 CONCLUSÕES

A análise proteômica permitiu avaliar o perfil proteico de películas adquiridas formadas sobre o esmalte e sobre a dentina, nos tempos de 10 minutos e 2 horas, bem como alterações neste perfil proteico em consequência da exposição da película formada a desafio erosivo (ácido cítrico 1% pH 2,5 por 20 segundos) ou cariogênico (ácido láctico 0,1 M pH 4,8 por 20 segundos).

Para o esmalte, a taxa de identificação de proteínas foi baixa (13 proteínas no total) e para a dentina, a taxa de identificação de proteínas foi maior (223 proteínas no total), sendo que a exposição ao ácido cítrico reduziu dramaticamente o número de proteínas identificado, o que não aconteceu para o ácido láctico. Proteínas ácido-resistentes foram identificadas tanto para o esmalte quanto para a dentina, destacando-se as queratinas e as mucinas, respectivamente. Estas proteínas, ou os peptídeos relacionados a elas responsáveis pelo efeito protetor, são candidatas a serem utilizadas para o enriquecimento de produtos odontológicos, visando à prevenção da cárie e erosão dentária.

Em virtude dos resultados obtidos, ambas as hipóteses nulas formuladas foram rejeitadas, pois a exposição das películas formadas sobre o esmalte e sobre a dentina a desafios ácidos cariogênicos ou erosivos alterou o seu perfil proteico, independentemente do tempo de formação da película.

Referências

REFERÊNCIAS

Amaechi BT, Higham SM. Eroded enamel lesion remineralization by saliva as a possible factor in the site-specificity of human dental erosion. *Arch Oral Biol.* 2001;46(8):697-703.

Amaechi BT, Higham SM, Edgar WM, Milosevic A. Thickness of acquired salivary pellicle as a determinant of the sites of dental erosion. *J Dent Res.* 1999;78(12):1821-8.

Ambatipudi KS, Hagen FK, Delahunty CM, Han X, Shafi R, Hryhorenko J, et al. Human common salivary protein 1 (CSP-1) promotes binding of *Streptococcus mutans* to experimental salivary pellicle and glucans formed on hydroxyapatite surface. *J Proteome Res.* 2010;9(12):6605-14.

Attin T, Meyer K, Hellwig E, Buchalla W, Lennon AM. Effect of mineral supplements to citric acid on enamel erosion. *Arch Oral Biol.* 2003;48(11):753-9.

Baden HP, Champliand MF, Sundberg JP, Viel A. Targeted deletion of the sciellin gene resulted in normal development and maturation. *Genesis.* 2005;42(4):219-28.

Bradway SD, Bergey EJ, Scannapieco FA, Ramasubbu N, Zawacki S, Levine MJ. Formation of salivary-mucosal pellicle: the role of transglutaminase. *Biochem J.* 1992;284 (Pt 2):557-64.

Buzalaf MA, Hannas AR, Kato MT. Saliva and dental erosion. *J Appl Oral Sci.* 2012;20(5):493-502.

Carlen A, Borjesson AC, Nikdel K, Olsson J. Composition of pellicles formed in vivo on tooth surfaces in different parts of the dentition, and in vitro on hydroxyapatite. *Caries Res.* 1998;32(6):447-55.

Cheaib Z, Lussi A. Impact of acquired enamel pellicle modification on initial dental erosion. *Caries Res.* 2011;45(2):107-12.

Culp DJ, Robinson B, Parkkila S, Pan PW, Cash MN, Truong HN, et al. Oral colonization by *Streptococcus mutans* and caries development is reduced upon deletion of carbonic anhydrase VI expression in saliva. *Biochim Biophys Acta.* 2011;1812(12):1567-76.

Deimling D, Hannig C, Hoth-Hannig W, Schmitz P, Schulte-Monting J, Hannig M. Non-destructive visualisation of protective proteins in the in situ pellicle. *Clin Oral Investig.* 2007;11(3):211-6.

DePaola DP. Saliva: the precious body fluid. *J Am Dent Assoc.* 2008;139 Suppl:5S-6S.

Featherstone JD, Behrman JM, Bell JE. Effect of whole saliva components on enamel demineralization in vitro. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1993;4(3-4):357-62.

Gibbons RJ. Bacterial adhesion to oral tissues: a model for infectious diseases. *J Dent Res.* 1989;68(5):750-60.

Gibbons RJ, Etherden I. Comparative hydrophobicities of oral bacteria and their adherence to salivary pellicles. *Infect Immun.* 1983;41(3):1190-6.

Gibbons RJ, Hay DI. Human salivary acidic proline-rich proteins and statherin promote the attachment of *Actinomyces viscosus* LY7 to apatitic surfaces. *Infect Immun.* 1988;56(2):439-45.

Gibbons RJ, Hay DI, Schlesinger DH. Delineation of a segment of adsorbed salivary acidic proline-rich proteins which promotes adhesion of *Streptococcus gordonii* to apatitic surfaces. *Infect Immun.* 1991;59(9):2948-54.

Glantz PO, Baier RE, Christersson CE. Biochemical and physiological considerations for modeling biofilms in the oral cavity: a review. *Dent Mater.* 1996;12(3):208-14.

Hahn Berg IC, Lindh L, Arnebrant T. Intraoral lubrication of PRP-1, statherin and mucin as studied by AFM. *Biofouling.* 2004;20(1):65-70.

Hall AF, Buchanan CA, Millett DT, Creanor SL, Strang R, Foye RH. The effect of saliva on enamel and dentine erosion. *J Dent.* 1999;27(5):333-9.

Hannig C, Becker K, Hausler N, Hoth-Hannig W, Attin T, Hannig M. Protective effect of the in situ pellicle on dentin erosion - an ex vivo pilot study. *Arch Oral Biol.* 2007;52(5):444-9.

Hannig C, Berndt D, Hoth-Hannig W, Hannig M. The effect of acidic beverages on the ultrastructure of the acquired pellicle--an in situ study. Arch Oral Biol. 2009;54(6):518-26.

Hannig C, Hamkens A, Becker K, Attin R, Attin T. Erosive effects of different acids on bovine enamel: release of calcium and phosphate in vitro. Arch Oral Biol. 2005;50(6):541-52.

Hannig C, Hannig M, Attin T. Enzymes in the acquired enamel pellicle. Eur J Oral Sci. 2005;113(1):2-13.

Hannig C, Spitzmuller B, Hannig M. Transaminases in the acquired pellicle. Arch Oral Biol. 2009a;54(5):445-8.

Hannig C, Spitzmuller B, Hannig M. Characterisation of lysozyme activity in the in situ pellicle using a fluorimetric assay. Clin Oral Investig. 2009b;13(1):15-21.

Hannig C, Spitzmuller B, Miller M, Hellwig E, Hannig M. Intrinsic enzymatic crosslinking and maturation of the in situ pellicle. Arch Oral Biol. 2008;53(5):416-22.

Hannig M. Ultrastructural investigation of pellicle morphogenesis at two different intraoral sites during a 24-h period. Clin Oral Investig. 1999;3(2):88-95.

Hannig M. The protective nature of the salivary pellicle. International Dental Journal. 2002;52(5):417-23.

Hannig M, Balz M. Influence of in vivo formed salivary pellicle on enamel erosion. Caries Res. 1999;33(5):372-9.

Hannig M, Fiebiger M, Guntzer M, Dobert A, Zimehl R, Nekrashevych Y. Protective effect of the in situ formed short-term salivary pellicle. Arch Oral Biol. 2004;49(11):903-10.

Hannig M, Hess NJ, Hoth-Hannig W, De Vrese M. Influence of salivary pellicle formation time on enamel demineralization--an in situ pilot study. Clin Oral Investig. 2003;7(3):158-61.

Hannig M, Joiner A. The structure, function and properties of the acquired pellicle. Monogr Oral Sci. 2006;19:29-64.

Hanning M, Joiner A. The structure, function and properties of the acquired pellicle. In: Duckworth RM, editor. The teeth and their environment physical, chemical and biochemical influences. 1 ed. Basel: Karger; 2006. p. 154.

Hara AT, Ando M, Gonzalez-Cabezas C, Cury JA, Serra MC, Zero DT. Protective effect of the dental pellicle against erosive challenges in situ. J Dent Res. 2006;85(7):612-6.

Hara AT, Zero DT. The caries environment: saliva, pellicle, diet, and hard tissue ultrastructure. Dent Clin North Am. 2010;54(3):455-67.

Hay DI, Bennick A, Schlesinger DH, Minaguchi K, Madapallimattam G, Schluckebier SK. The primary structures of six human salivary acidic proline-rich proteins (PRP-1, PRP-2, PRP-3, PRP-4, PIF-s and PIF-f). Biochem J. 1988;255(1):15-21.

Helmerhorst EJ, Alagl AS, Siqueira WL, Oppenheim FG. Oral fluid proteolytic effects on histatin 5 structure and function. Arch Oral Biol. 2006;51(12):1061-70.

Hemingway CA, White AJ, Shellis RP, Addy M, Parker DM, Barbour ME. Enamel erosion in dietary acids: inhibition by food proteins in vitro. Caries Res. 2010;44(6):525-30.

Jensen JL, Lamkin MS, Oppenheim FG. Adsorption of human salivary proteins to hydroxyapatite: a comparison between whole saliva and glandular salivary secretions. J Dent Res. 1992;71(9):1569-76.

Joiner A, Schwarz A, Philpotts CJ, Cox TF, Huber K, Hannig M. The protective nature of pellicle towards toothpaste abrasion on enamel and dentine. J Dent. 2008;36(5):360-8.

Kensche A, Reich M, Kummerer K, Hannig M, Hannig C. Lipids in preventive dentistry. Clin Oral Investig. 2013;17(3):669-85.

Kimura S, Sato K, Banno Y, Nagase T, Ueda H. The Importance of Interaction with Membrane Lipids through the Pleckstrin Homology Domain of the Guanine Nucleotide Exchange Factor for Rho Family Small Guanosine Triphosphatase, FLJ00018. Biol Pharm Bull. 2013;36(7):1204-7.

Larsen MJ, Nyvad B. Enamel erosion by some soft drinks and orange juices relative to their pH, buffering effect and contents of calcium phosphate. *Caries Res.* 1999;33(1):81-7.

Lee YH, Zimmerman JN, Custodio W, Xiao Y, Basiri T, Hatibovic-Kofman S, et al. Proteomic Evaluation of Acquired Enamel Pellicle during In Vivo Formation. *PLoS One.* 2013;8(7):e67919.

Leinonen J, Kivela J, Parkkila S, Parkkila AK, Rajaniemi H. Salivary carbonic anhydrase isoenzyme VI is located in the human enamel pellicle. *Caries Res.* 1999;33(3):185-90.

Lenander-Lumikari M, Loimaranta V. Saliva and dental caries. *Adv Dent Res.* 2000;14:40-7.

Lendenmann U, Grogan J, Oppenheim FG. Saliva and dental pellicle--a review. *Adv Dent Res.* 2000;14:22-8.

Leont'ev VK, Aleksina OA, Veselova MN, Poltorak OM, Chukhrai ES. [Enzyme immobilization on the dental enamel and its probable role in the physiology and pathology of the oral cavity]. *Stomatologiya (Mosk).* 1992;(2):6-7.

Li J, Helmerhorst EJ, Yao Y, Nunn ME, Troxler RF, Oppenheim FG. Statherin is an in vivo pellicle constituent: identification and immuno-quantification. *Arch Oral Biol.* 2004;49(5):379-85.

Masson N, Domingues RR, Cury JA, Paes Leme AF. Acidulated phosphate fluoride application changes the protein composition of human acquired enamel pellicle. *Caries Res.* 2013;47(3):251-8.

Maynadier M, Vezenkov LL, Amblard M, Martin V, Gandreuil C, Vaillant O, et al. Dipeptide mimic oligomer transporter mediates intracellular delivery of Cathepsin D inhibitors: A potential target for cancer therapy. *J Control Release.* 2013.

Moreno EC, Kresak M, Hay DI. Adsorption thermodynamics of acidic proline-rich human salivary proteins onto calcium apatites. *J Biol Chem.* 1982;257(6):2981-9.

Moreno EC, Varughese K, Hay DI. Effect of human salivary proteins on the precipitation kinetics of calcium phosphate. *Calcif Tissue Int.* 1979;28(1):7-16.

Oppenheim FG, Yang YC, Diamond RD, Hyslop D, Offner GD, Troxler RF. The primary structure and functional characterization of the neutral histidine-rich polypeptide from human parotid secretion. *J Biol Chem*. 1986;261(3):1177-82.

Proctor GB, Hamdan S, Carpenter GH, Wilde P. A statherin and calcium enriched layer at the air interface of human parotid saliva. *Biochem J*. 2005;389(Pt 1):111-6.

Reich M, Hannig C, Al-Ahmad A, Bolek R, Kummerer K. A comprehensive method for determination of fatty acids in the initial oral biofilm (pellicle). *J Lipid Res*. 2012;53(10):2226-30.

Rison SC, Hodgman TC, Thornton JM. Comparison of functional annotation schemes for genomes. *Funct Integr Genomics*. 2000;1(1):56-69.

Samuels TL, Handler E, Syring ML, Pajewski NM, Blumin JH, Kerschner JE, et al. Mucin gene expression in human laryngeal epithelia: effect of laryngopharyngeal reflux. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2008;117(9):688-95.

Schlueter N, Hara A, Shellis RP, Ganss C. Methods for the measurement and characterization of erosion in enamel and dentine. *Caries Res*. 2011;45 Suppl 1:13-23.

Schupbach P, Oppenheim FG, Lendenmann U, Lamkin MS, Yao Y, Guggenheim B. Electron-microscopic demonstration of proline-rich proteins, statherin, and histatins in acquired enamel pellicles in vitro. *Eur J Oral Sci*. 2001;109(1):60-8.

Siqueira WL, Bakkal M, Xiao Y, Sutton JN, Mendes FM. Quantitative proteomic analysis of the effect of fluoride on the acquired enamel pellicle. *PLoS One*. 2012;7(8):e42204.

Siqueira WL, Custodio W, McDonald EE. New insights into the composition and functions of the acquired enamel pellicle. *J Dent Res*. 2012;91(12):1110-8.

Siqueira WL, Margolis HC, Helmerhorst EJ, Mendes FM, Oppenheim FG. Evidence of intact histatins in the in vivo acquired enamel pellicle. *J Dent Res*. 2010;89(6):626-30.

Siqueira WL, Oppenheim FG. Small molecular weight proteins/peptides present in the in vivo formed human acquired enamel pellicle. *Arch Oral Biol.* 2009;54(5):437-44.

Siqueira WL, Salih E, Wan DL, Helmerhorst EJ, Oppenheim FG. Proteome of human minor salivary gland secretion. *J Dent Res.* 2008;87(5):445-50.

Siqueira WL, Zhang W, Helmerhorst EJ, Gygi SP, Oppenheim FG. Identification of protein components in in vivo human acquired enamel pellicle using LC-ESI-MS/MS. *J Proteome Res.* 2007;6(6):2152-60.

Skjorland KK, Rykke M, Sonju T. Rate of pellicle formation in vivo. *Acta Odontol Scand.* 1995;53(6):358-62.

Slomiany BL, Murty VL, Mandel ID, Sengupta S, Slomiany A. Effect of lipids on the lactic acid retardation capacity of tooth enamel and cementum pellicles formed in vitro from saliva of caries-resistant and caries-susceptible human adults. *Arch Oral Biol.* 1990;35(3):175-80.

Slomiany BL, Murty VL, Zdebska E, Slomiany A, Gwozdzinski K, Mandel ID. Tooth surface-pellicle lipids and their role in the protection of dental enamel against lactic-acid diffusion in man. *Arch Oral Biol.* 1986;31(3):187-91.

Soares RV, Lin T, Siqueira CC, Bruno LS, Li X, Oppenheim FG, et al. Salivary micelles: identification of complexes containing MG2, sIgA, lactoferrin, amylase, glycosylated proline-rich protein and lysozyme. *Arch Oral Biol.* 2004;49(5):337-43.

Sonju T, Rolla G. Chemical analysis of the acquired pellicle formed in two hours on cleaned human teeth in vivo. Rate of formation and amino acid analysis. *Caries Res.* 1973;7(1):30-8.

Stiefel DJ. Characteristics of an in vitro dental pellicle. *J Dent Res.* 1976;55(1):66-73.

Sun H, Lou X, Shan Q, Zhang J, Zhu X, Wang Y, et al. Proteolytic characteristics of cathepsin d related to the recognition and cleavage of its target proteins. *PLoS One.* 2013;8(6):e65733.

Tabak LA. Structure and function of human salivary mucins. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1990;1(4):229-34.

Totan A, Greabu M, Totan C, Spinu T. Salivary aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase and alkaline phosphatase: possible markers in periodontal diseases? Clin Chem Lab Med. 2006;44(5):612-5.

Vacca Smith AM, Bowen WH. In situ studies of pellicle formation on hydroxyapatite discs. Arch Oral Biol. 2000;45(4):277-91.

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

Wetton S, Hughes J, West N, Addy M. Exposure time of enamel and dentine to saliva for protection against erosion: a study in vitro. Caries Res. 2006;40(3):213-7.

Wiegand A, Bliggenstorfer S, Magalhaes AC, Sener B, Attin T. Impact of the in situ formed salivary pellicle on enamel and dentine erosion induced by different acids. Acta Odontol Scand. 2008;66(4):225-30.

Yao Y, Lamkin MS, Oppenheim FG. Pellicle precursor proteins: acidic proline-rich proteins, statherin, and histatins, and their crosslinking reaction by oral transglutaminase. J Dent Res. 1999;78(11):1696-703.

Zahradnik RT, Moreno EC, Burke EJ. Effect of salivary pellicle on enamel subsurface demineralization in vitro. J Dent Res. 1976;55(4):664-70.

Zimmerman JN, Custodio W, Hatibovic-Kofman S, Lee YH, Xiao Y, Siqueira WL. Proteome and peptidome of human acquired enamel pellicle on deciduous teeth. Int J Mol Sci. 2013;14(1):920-34.

Anexos

ANEXO A – Comitê de ética e pesquisa

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru
Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-901 – C.P. 73
PABX (0XX14)3235-8000 – FAX (0XX14)3223-4679

Comitê de Ética em Pesquisa (14)3235-8356
mferrari@fob.usp.br

Processo nº 037/2011

Bauru, 26 de maio de 2011.

Senhora Professora,

Informamos que após o envio da documentação solicitada, o projeto de pesquisa encaminhado a este Comitê de Ética em Pesquisa **Determinação da mudança na composição da película adquirida sobre esmalte e dentina após exposição ácida: estudo proteômico**, de autoria Taisa Ribas Delecode, sob sua orientação, foi novamente analisado em reunião realizada no dia **25 de maio de 2011**.

O CEP FOB/USP considerou o projeto APROVADO lembrando que a condição de aprovação da pesquisa propriamente dita exige o que segue:

- que sejam encaminhados ao CEP-FOB/USP relatórios anuais sobre o andamento da pesquisa (parciais e finais), conforme o cronograma apresentado;
- que sejam notificados ao CEP-FOB/USP, com a devida justificativa, qualquer modificação na metodologia e/ou título e a inclusão ou exclusão de autores;
- na apresentação do relatório final, incluir todos os TCLEs e/ou termos de doação de dentes devidamente assinados e rubricados.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Flávio Augusto Cardoso de Faria
Coordenador

Profª Drª Marília Afonso Rabelo Buzalaf
Docente do Departamento de Ciências Biológicas

Anexo B – Termo de consentimento livre esclarecido (TCLE)

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru

Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-901 – C.P. 73
 PABX (0XX14)3235-8000 – FAX (0XX14)3223-4679

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Vimos, por meio deste, convidá-lo a participar de uma pesquisa onde serão analisadas as proteínas que restam sobre os dentes após contato com diferentes tipos de ácidos.

O experimento será realizado em quatro dias consecutivos, tendo início às 8 horas da manhã. Os voluntários receberão uma meticulosa profilaxia dentária com pedra pomes. Em seguida, serão colocados moldes contendo blocos de esmalte e dentina na cavidade bucal para que uma película se forme naturalmente sobre o esmalte e dentina. A película formada será coletada após 10 minutos e 120 minutos, sendo coletados 6 blocos de esmalte e 6 de dentina em cada tempo. Durante este período, os voluntários serão privados do consumo de alimentos e bebidas.

Quanto aos benefícios oferecidos a você, no início do estudo será feito um exame clínico em relação às condições bucais e o resultado deste exame será prontamente informado a você. Caso seja detectado algum problema, faremos o encaminhamento à clínica responsável da FOB. Além disto, no final do estudo, serão dadas instruções sobre higiene bucal, por escrito e verbalmente. A participação será voluntária e entende-se que você poderá fazer qualquer pergunta sobre os procedimentos, sendo que será livre para desistir de participar a qualquer momento, sem nenhum prejuízo de sua parte. Em adição, você terá, também, por parte dos pesquisadores, a garantia do sigilo que assegura a sua privacidade. Destacamos ainda que não há risco nenhum à sua saúde com a participação nesta pesquisa, já que você apenas utilizará a moldes contendo os blocos devidamente esterilizados.

Concordando em participar, você entende que este estudo será realizado em benefício das ciências médica e odontológica, e desta forma concorda com a divulgação dos dados obtidos por meio de publicações científicas.

Caso queira apresentar reclamações em relação à sua participação na pesquisa, poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da FOB-USP, no endereço Al. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 (sala no prédio da Biblioteca, FOB-USP) ou pelo telefone (14) 3235-8356. Para maiores esclarecimentos de dúvidas sobre a pesquisa você pode, a qualquer momento, contatar a pesquisadora (Taisa Ribas Delecode) pelos telefones (14)3235-8246 ou (14) 8112-6577.

Pelo presente instrumento que atende às exigências legais, o Sr. (a)

_____, portador da cédula de identidade _____, após leitura minuciosa das informações constantes neste **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**, devidamente explicada pelos profissionais em seus mínimos detalhes, ciente dos serviços e procedimentos aos quais será submetido, não restando quaisquer dúvidas a respeito do lido e explicado, firma seu **CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO** concordando em participar da pesquisa proposta.

Fica claro que o sujeito da pesquisa ou seu representante legal, pode a qualquer momento retirar seu **CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO** e deixar de participar desta pesquisa e ciente de que todas as informações prestadas tornar-se-ão confidenciais e guardadas por força de sigilo profissional (Art. 9º do Código de Ética Odontológica).

Por estarem de acordo assinam o presente termo.

Bauru-SP, _____ de _____ de 2011.

 Assinatura do sujeito da pesquisa

 Taisa Ribas Delecode
 Autora