UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

MELINA RODRIGUES BELLINI

Determinação da composição da película adquirida formada *in situ* sobre esmalte e dentina humanos através de análise proteômica

BAURU
2013

MELINA RODRIGUES BELLINI

Determinação da composição da película adquirida formada *in situ* sobre esmalte e dentina humanos através de análise proteômica

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

Bellini, Melina Rodrigues

B417d

Determinação da composição da película adquirida formada *in situ* sobre esmalte e dentina humanos através de análise proteômica / Melina Rodrigues Bellini – Bauru, 2013.

161p. : 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: 038/2011
Data: 28/04/2011

DEDICATÓRIA

Dedico de todo meu coração este trabalho à **Deus**, que tem acompanhado sempre os meus passos, e aberto os caminhos, e direcionado sempre minha vida. Mostrando que a minha coragem deve ser maior que meu medo; e minha força deve ser tão grande quanto a minha fé.

"Pois quando a sabedoria entrar no teu coração, e o conhecimento for agradável a tua alma, o bom siso te guardará e a inteligência te conservará". (Provérbios 2:10-11) (...) Staring up the road and pray to god I see headlights. (Darius Rucker).

Dedico este trabalho aos meus pais, **Rosângela e Vanderlei**, os quais me deram o maior bem o qual eu possuo: a vida. Eu agradeço muito por tudo o que vocês sempre fazem por mim. Vocês são meus exemplos de vida, por mostrar que sem esforço jamais atingiremos o alto da montanha. Por não deixarem que eu desanime no meio da estrada, e mostrarem que só atingimos o cimo da montanha se estivermos decidido a enfrentar o esforço da caminhada. Obrigada por sempre me orientarem, e me auxiliarem quando eu mais preciso, sou muito feliz de ser filha de vocês!
Eu amo MUITO vocês!

"Vá firme na direção das suas metas.
Porque o pensamento cria, o desejo atrai e a fé realiza".

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Meus sinceros agradecimentos à minha querida orientadora ***Prof ª. Drª. Marília Afonso Rabelo Buzalaf***. Professora, não teria palavras pra descrever a senhora, que sempre se disponibilizou de muita paciência para me auxiliar. Mas pode ter certeza que a senhora tem todo meu carinho, respeito e muita admiração. Meus agradecimentos provêm de todo esse tempo que trabalhamos juntas. A senhora sempre me recebeu de portas abertas na bioquímica. Tenho muito orgulho pela senhora ter sido minha orientadora. A senhora sabe que tem muito reconhecimento no mundo científico: e parabéns professora, por não perder a humildade e simplicidade. Pode ter certeza, que a senhora tem o maior merecimento do mundo, por estar onde esta. Sou muito feliz, por ter a senhora ao meu lado com uma postura séria, honesta e ética e acredito que todos que têm a oportunidade de conhecê-la sabem do que eu estou falando. Reconheço que apesar de estar nesse meio acadêmico que sempre exige muito, a senhora sempre está de coração aberto para os seus alunos. Agradeço pelo maravilhoso trabalho que fizemos juntas, e por me aceitar em ser sua orientada. Se tivesse que voltar ao passado escolher tudo de novo, escolheria novamente a senhora e tudo o que passamos juntas. Isso me trouxe a oportunidade de ver a vida de outra forma. Tanto para o profissional, quanto para o pessoal. Muito obrigada por fazer parte de tudo isso. Agradeço a Deus, por tê-la colocado em minha vida. MUITO obrigada por tudo!

Ao meu co-orientador, **Prof. Dr. Walter L. Siqueira**, por ter concedido uma grande oportunidade na execução do projeto, o que contribuiu muito para a finalização do mesmo. E por ter disponibilizado de tempo e conhecimento para me ensinar. Admiro o senhor também pela tamanha dedicação e conhecimento. Muito obrigada por estar nessa equipe e prover a experiência incrível da oportunidade de fazer um estágio no exterior. Pode ter certeza absoluta que isso me fez olhar o mundo de outra forma, e perceber o quanto é válido na carreira acadêmica.

Ambição é o caminho para o sucesso. Persistência é o veículo no qual se chega lá."

(Bill Eardley).

"I am among those who think that science has great beauty. A scientist in his laboratory is not only a technician: he is also a child placed before natural phenomena which impress him like a fairy tale. We should not allow it to be believed that all scientific progress can be reduced to mechanisms, machines, gearings, even though such machinery also has its beauty.

Neither do I believe that the spirit of adventure runs any risk of disappearing in our world. If I see anything vital around me, it is precisely that spirit of adventure, which seems indestructible and is akin to curiosity."

(Maria Skłodowska-Curie, 1933).

Gostaria de agradecer a toda minha ***Família***, que sempre são muito carinhosos comigo. E por sempre me fazer sentir amada. Em especial: meus primos e primas vocês são lindos e maravilhosos! Aos meus queridos avós: ***Luzia, José e Adelaide*** *(in memorian)*, vocês são muito especiais! Jamais irei me esquecer de todo cuidado que vocês têm/tiveram comigo, amo muito vocês!

Aos ***voluntários***, por contribuírem imensamente na realização desta pesquisa: por cederem o tempo e ajuda de vocês. Sem vocês, não seria possível. Além das queridas dentistas que ajudaram muito no trabalho: ***Clarissa Fonseca, Flávia Levy, Senda Charone e Angela Blumer***. Muito obrigada!

A todos os amigos e amigas: ***Tatiane Bigoto, Letícia Marrone, Mônica Campos, Jéssica Godoy, Jéssica Martins, Grazzi, Bárbara Pereira, Camila, Isa Frederico, Laiza, Amanda, Aline e Lívia Bertozzo, Marcela Gonçalves, Marcel, Letícia Daré, Le Faria, Jé Oliveira, Priscila Muno, Joyce, João Menezes, Rafinha, Bruno Zarella e Farooque.*** Sou muito grata por tudo que já passamos juntos. Cada um de vocês sabem o quanto são especiais. E merecem sempre o melhor que a vida pode oferecer! Obrigada por sempre estarem aqui comigo, em meu coração. E permitir que eu esteja com vocês também. Em especial ao ***prof. Dr. Dejair Nascimento***, pela contribuição na minha vida acadêmica, por estar sempre presente e me ajudando!

Agradeço a todos do ***Projeto Alegria***: pelo crescimento diário que este trabalho voluntário me proporciona. Eu realmente aprendi que a alegria: é um "ótimo remédio", e quando compartilhada é em dobro. Tenho grande admiração por vocês.

Meus sinceros agradecimentos às pessoas que eu tive o enorme prazer em conhecer: ***Elisa Berwanger e Lúcio Barreto, Alina Reid, Dusa Vukosavljevic, Meltem Bakkal, Rodney, Donatello, Tayebeh Basiri, William Custodio, Letícia Klain Cristofolett e Marco Aurélio Bazelatto Zanoni:*** Muito obrigada pelo convívio, e pelos ótimos momentos que passamos juntos! Vocês jamais serão esquecidos.

"All our dreams can come true, if we have the courage to pursue them"
(Walt Disney).

De modo MUITO especial, gostaria de agradecer as meninas *LINDAS* da película adquirida. Profa. Marília e Prof. Walter jamais irão se esquecer de nós! **Muito obrigada**: *Taisa Delecrode* e *Flávia Zaidan* saibam que tenho um grande carinho pelas duas. **Taisa**, muito obrigada por esse tempo de convívio e por tudo o que você me ensinou. E me ensinou: MUITO tanto profissionalmente quanto pra uma vida inteira. Agradeço por toda ajuda que você me concedeu, por todas as viagens ao *Sincontron*, pelos géis, e claro pelas coletas. Você é ótima, tem um coração maravilhoso e com certeza irá realizar todos seus objetivos, e encontrar seu lugar ao sol. Pois você é merecedora de tudo isso. Tem uma capacidade formidável, para tal! **Flávia**, meus agradecimentos são pela amizade que você me concedeu e pelos ensinamentos nesse mestrado. Isso foi mais que um presente! Faz parte do meu amadurecimento, vejo em você uma pessoa de muita coragem, e merecedora de um grande sucesso. Você é muito especial, sou muito orgulhosa e grata por ter trabalhado com você também!

Muito obrigada pelo tempo que ficamos juntas no Canadá. Foi uma experiência maravilhosa! Obrigada por tudo o que vocês me ajudaram, pelos obstáculos vencidos! Amei de todo meu coração, e faria tudo novamente!

"We must find time to stop and thank the people who make a difference in our lives." *(John F. Kennedy).*

AGRADECIMENTOS

À ***FAPESP***, processo: 2010/13865-1, por todo auxílio financeiro fornecido através da bolsa de estudos, que viabilizou a realização e conclusão deste projeto.

À ***Faculdade de Odontologia de Bauru,*** na pessoa de seu Diretor ***Prof. Dr. José Carlos Pereira***, a qual confere uma estrutura formidável, meus agradecimentos pela oportunidade de cursar o mestrado nesta universidade. À ***Comissão de Pós-Graduação***, na sua pessoa o presidente, Prof. Dr. Paulo Rodrigues Conti, e a ***Biblioteca*** pelo auxílio e orientação. Em especial, à ***Vera Lucia***, secretária do Departamento de Ciências Biológicas, sempre tão prestativa e muito querida!

Agradeço aos professores da Disciplina de Bioquímica: ***Prof. Dr. Rodrigo Cardoso*** e ***Profª. Drª. Ana Carolina Magalhães***, por serem pessoas de muito conhecimento. Também agradeço aos professores da Disciplina de Anatomia: ***Prof. Dr. Antonio de Castro Rodrigues*** e ***Prof. Dr. Jesus Carlos Andreo*** os quais me deram a oportunidade de estágio, e me recebrem tão bem no laboratório, jamais irei esquecer todos os ensinamentos, sou muito grata! E ao funcionário ***Ovídio*** por todo o conhecimento transmitido. A todos os funcionários do Laboratório de Bioquímica: ***Thelma, Aline e Larissa***, meus sinceros agradecimentos por toda ajuda! E também a ***todos*** os alunos de pós-graduação do laboratório, têm a minha gratidão. E desejo o melhor sempre a vocês! ***"O rio atinge seus objetivos, porque aprendeu a contornar obstáculos"*** *(Lao-Tsé).*

À ***Western University*** (Schulich School of Medicine and Dentistry), por dar suporte e incentivar tanto a pesquisa. A todos os alunos e funcionários do *Siqueira Lab*, em especial a ***Cindy Xiao***, pela grande ajuda nos experimentos e pelo ótimo convívio, uma pessoa muito inteligente e se mostrando sempre prestativa. *Thanks ever so much!*

*"A **gratidão** desbloqueia a abundância da vida: ela torna o que temos em suficiente, e mais torna a negação em aceitação, caos em ordem, confusão em claridade. A gratidão pode transformar uma refeição em um banquete, uma casa em um lar, um estranho em um amigo. A gratidão dá sentido ao nosso passado, traz paz para o hoje, e cria uma visão para o futuro"*

Melody Beattie.

RESUMO

A película adquirida (PA) é um filme formado pela adsorção seletiva de proteínas, glicoproteínas e lipídeos à superfície dentária. A presença de proteínas na PA forma uma interface protetora sobre a superfície do dente, participando em todos os eventos interfaciais que ocorrem na cavidade bucal, tais como des- e remineralização, lubrificação das superfícies dos dentes, e aderência bacteriana. Com o advento da proteômica, tem havido um aumento considerável no conhecimento acerca do perfil proteico de PAs adquiridas formadas sobre o esmalte dentário, em diferentes situações, mas nenhum trabalho até o momento descreveu o perfil proteômico de PAs formadas sobre a dentina. Este estudo foi pioneiro em comparar o perfil proteico de PAs formadas *in situ* sobre o esmalte e a dentina, nos tempos de 10 minutos e 2 horas, utilizando análise proteômica quantitativa livre de marcadores. Os experimentos foram realizados por três dias consecutivos. Em cada dia, os 9 voluntários receberam profilaxia dentária e em seguida utilizaram um aparelho vestibular com 6 blocos de esmalte e 6 de dentina humanos por 10 minutos ou 2 horas. Após esses períodos, a PA formada era coletada com auxílio de um papel filtro de eletrodos embebido em ácido cítrico 3%. Para as análises foi realizado um *pool* com os papéis dos 9 voluntários de todos os dias, para cada substrato e tempo de formação. Após a extração e digestão das proteínas, a separação dos peptídeos foi realizada por nano-HPLC (nano-Cromatografia Líquida de Alta Performace), interligada a um espectrômetro de massa (nLC-ESI-MS/MS). Os dados MS/MS obtidos foram processados e pesquisados em bancos de dados de proteínas humanas (UniProt e TrEMBL), utilizando o algoritmo SEQUEST no *software* Proteome Discoverer 1.3. Para a PA formada sobre o esmalte, foram identificadas 160 e 64 proteínas, nos tempos de formação de 10 minutos e 2 horas, respectivamente. Os respectivos números de proteínas identificadas para a dentina foram 86 e 52, respectivamente. Nos tempos de 10 minutos e 2 horas, respectivamente, 25 e 11 proteínas foram comuns a ambos os substratos e foram submetidas à quantificação livre de marcadores (SIEVE), revelando que a maioria das proteínas com diferença de expressão entre os dois substratos teve sua expressão aumentada na dentina. Foram identificadas ainda, no tempo de 10 minutos de formação da PA, 135 e 61 proteínas exclusivas ao esmalte ou à dentina, respectivamente. O número correspondente de proteínas exclusivas para o tempo

de 2 horas foi de 53 e 41 proteínas, para o esmalte e dentina, respectivamente. Dentre as proteínas exclusivas da dentina, foram identificadas várias proteínas relacionadas ao complexo cálcio/calmodulina, assim como proteínas associadas à tumorigênese e à fosforilação/desfosforilação de proteínas. Em adição, muitas das proteínas identificadas no presente estudo, tanto para o esmalte quanto para a dentina, ainda não foram caracterizadas e, portanto, não têm função conhecida na PA. Sua caracterização e estudos funcionais futuros poderão trazer novos horizontes no entendimento da importância da PA para a proteção da estrutura dentária, bem como do papel da PA como sítio de biomarcadores para doenças bucais e sistêmicas.

Palavras-chave: Película adquirida; proteômica; esmalte; dentina; nLC-ESI-MS/MS.

ABSTRACT

Determination of the composition of the acquired pellicle formed *in situ* on human enamel and dentin: proteomic study

The acquired pellicle (AP) is a film that results from selective adsorption of proteins, glicoproteins and lipids on the tooth surface. The presence of proteins in the AP forms a protective interface on the tooth surface that participates in all the surface events occurring in the oral cavity, such as de- and remineralization, lubrification of the tooth surfaces and bacterial adherence. With the advent of Proteomics, considerable increase in the knowledge of the protein profile of the AP formed on tooth enamel, under different circunstances, has been observed. However, so far the proteomic profile of the AP formed on dentin has not been described. This is the first study to compare the proteomic profile of APs formed *in situ* for 10 minutes and 2 hours, on enamel and dentin, using quantitative label-free proteomics. The experiments were conducted for 3 consecutive days. Each day, 9 volunteers were submitted to dental prophylaxis and in sequence wore a vestibular device containing 6 human enamel and 6 human dentin blocks for 10 minutes or 2 hours. After these periods, the PA formed was collected with an electrode filter paper soaked in 3% citric acid. The papers from the 9 volunteers, for each substrate and time of pellicle formation were pooled and used for analysis. After protein extraction and digestion, peptides were separated by nano-HPLC (High-performance liquid chromatography) coupled to a mass spectrometer (nLC-ESI-MS/MS). The obtained MS/MS spectra were searched against human protein databases (UniProt and TrEMBL) using SEQUEST algorithm in Proteome Discoverer 1.3 software. For the AP formed on enamel, 160 and 64 proteins were identified for the times of pellicle formation of 10 minutes and 2 hours, respectively. The respective numbers of identified proteins for dentin were 86 and 52, respectively. For the times of 10 minutes and 2 hours, respectively, 25 and 11 proteins were common to both substrates. They were submitted to label-free quantification, which revealed that most of the proteins with differential expression were overexpressed in the dentin. For APs formed for 10 minutes, 135 and 61 proteins were identified exclusively for enamel or dentin, respectively. The corresponding number for the 2-hour APs was 53 and 41 proteins, respectively. Among the proteins identified exclusively in dentin, many proteins

related with calcium/calmodulin complex, as well as proteins associated with tumorigenesis and protein phosphorylation/dephosphorylation were found. In addition, many of the identified proteins, both for enamel and dentin, remain uncharacterized and, therefore have no described function in the AP. In the future, their characterization and functional studies might open new avenues for the understanding of the importance of the AP for the protection of the dental structure, as well as for the use of the AP as a site for biomarkers of oral and systemic diseases.

Key words: Acquired pellicle; proteomics, enamel, dentin, nLC-ESI-MS/MS.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Desenho esquemático de formação de película. 30

Figura 2 - Esquema ilustrando o delineamento experimental do projeto. 60

Figura 3 - Espécimes sendo fixados na placa acrílica para planificação da base..... 62

Figura 4 - Confecção do dispositivo vestibular 63

Figura 5 - Profilaxia e fixação dos blocos de esmalte e dentina no dispositivo vestibular. 64

Figura 6 - Agrupamento das amostras de PA. 66

Figura 7 - Curva padrão do µBCA. 69

Figura 8 - Cromatograma base-pico de cada grupo estudado. **(A)** *pool* de amostras de película adquirida do esmalte formada no tempo de 10 minutos. **(B)** *pool* de película adquirida do esmalte formada no tempo de 2 horas. 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. 76

Figura 9 - Exemplo de cromatograma base-pico de cada grupo estudado. **(A)** *pool* de película adquirida da dentina formada no tempo de 10 minutos. **(B)** *pool* de película adquirida da dentina formada no tempo de 2 horas. 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. 77

Figura 10 - Distribuição do número de proteínas identificadas a partir da PA formada sobre o esmalte em diferentes tempos. 78

Figura 11 - Distribuição do número de proteínas identificadas a partir da PA formada sobre a dentina em diferentes tempos. 79

Figura 12 - Diagrama de Venn mostrando o número de proteínas identificadas em cada grupo. **(A)** Proteínas da PA formada no esmalte após diferentes tempos (10 minutos e 2 horas). **(B)** Proteínas da PA formada na dentina após diferentes tempos (10 minutos e 2 horas)..... 94

Figura 13 - Diagrama de Venn mostrando o número de proteínas identificadas em cada grupo. **(A)** Proteínas da PA formada após 10 minutos sobre o esmalte e dentina. **(B)** Proteínas da PA formada após 2 horas sobre esmalte e dentina. 104

Figura 14 - Distribuição da origem das proteínas identificadas na PA formada sobre o esmalte por 10 minutos. 129

Figura 15 - Distribuição da origem das proteínas identificadas na PA formada sobre o esmalte por 2 horas. 130

Figura 16 - Distribuição da origem das proteínas identificadas na PA formada sobre a dentina por 10 minutos. 130

Figura 17 - Distribuição da origem das proteínas identificadas na PA formada sobre a dentina por 2 horas 131

Figura 18 - Distribuição funcional das proteínas identificadas na PA formada sobre o esmalte 10 minutos, de acordo com Rison 132

Figura 19 - Distribuição funcional das proteínas identificadas na PA formada sobre o esmalte 2 horas, de acordo com Rison 132

Figura 20 - Distribuição funcional das proteínas identificadas na PA formada sobre a denrtina formada em 10 minutos, de acordo com Rison 133

Figura 21 - Distribuição funcional das proteínas identificadas na PA formada sobre a denrtina formada em 2 horas, de acordo com Rison 134

Figura 22 - Distribuição das interações das proteínas identificadas na PA formada sobre o esmalte no período de 10 minutos 135

Figura 23 - Distribuição das interações das proteínas identificadas na PA formada sobre o esmalte no período de 2 horas. 135

Figura 24 - Distribuição das interações das proteínas identificadas na PA formada sobre a dentina no período de 10 minutos 136

Figura 25 - Distribuição das interações das proteínas identificadas na PA formada sobre a dentina no período de 2 horas 137

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Proteínas presentes na PA formada *in situ* sobre o esmalte no tempo de 10 minutos. 82

Tabela 2 - Proteínas presentes na PA formada *in situ* sobre o esmalte no tempo de 2 horas. 86

Tabela 3 - Proteínas presentes na PA formada *in situ* sobre a dentina no tempo de 10 minutos. 89

Tabela 4 - Proteínas presentes na PA formada *in situ* sobre a dentina no tempo de 2 horas. 92

Tabela 5 - Proteínas presentes exclusivamente na PA formada *in situ* sobre o esmalte. 97

Tabela 6 - Proteínas presentes exclusivamente na PA formada *in situ* sobre a dentina. 102

Tabela 7 - Quantificação (SIEVE) das proteínas presentes na PA formada sobre o esmalte (E) e dentina (D) em 10 minutos 105

Tabela 8 - Proteínas presentes exclusivamente na PA formada *in situ* sobre o esmalte e dentina por 10 minutos. 110

Tabela 9 - Quantificação (SIEVE) das proteínas presentes na PA formada sobre o esmalte (E) e dentina (D) em 2 horas 115

Tabela 10 - Proteínas presentes exclusivamente na PA formada *in situ* sobre o esmalte e dentina. 118

Tabela 11 - Classificação das proteínas identificadas na PA formada *in situ* sobre o esmalte ou dentina nos tempos de 10 minutos e 2 horas. 121

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

%	Porcentagem
<	Menor
±	Mais ou menos
µL	Microlitros
µm	Micrômetro
Å	Ångström
ADMTS-16	A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 16
AFM	Microscopia de força atômica
APF	Fluorfosfato acidulado
ARPP 21	cAMP-regulated phosphoprotein 21
C3	Fator de complemento
Ca	Cálcio
CAMSAP1	Calmodulin regulated spectrin-associated protein
CASR	Calcium sensing receptor
CD44	CD44 antigen
cDNA	DNA complementar
CID	Dissociação induzida por colisão / *collision-induced dissociation*
CLASP1	*CLIP-associating protein 1*
cm	Centímetros
CO_2	Dióxido de carbôno
CPs	cisteína-proteases
Cu^{+}	Cobre
Cu^{+2}	Cobre
Da	Dalton
DP	Desvio padrão
DTT	Ditiotreitol
ESI-MS/MS	Espectrometria de massas com ionização por *eletrospray* / *Electrospray tandem mass spectrometry*
fmol	Femtomoles
FT-ICR	Ressonância ciclotrônica de íons transformada de Fourier
g	gramas
G	Força centrífuga em medida da gravidade terrestre
H^{+}	Hidrogênio
H_2O	Água
HCl	Ácido clorídrico
HCO_3^{-}	Bicarbonato
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
Ig A	Imunoglobulina A

Ig G	Imunoglobulina G
Ig M	Imunoglobulina M
kDa	Kilodalton
KHz	Quilohertz
KIAA0649	Protein phosphatase 1 regulatory subunit 26
kV	Quilovolts
L	Litros
LZTS2	Leucine zipper putative tumor suppressor 2
M	Molar
m/z	Razão entre massa e carga
MALDI-TOF/TOF	Dessorção a Laser Assistida por Matriz – Tempo de vôo / *Matrix-assisted laser desorption ionization- time of flight*
MAP6	*Microtubule-associated protein 6*
MAPK	Proteínas quinases ativadas por mitógenos / *Mitogen Activated Protein Kinases*
mBCA	Micro ácido bicinconínico / *Micro Bicinchoninic Acid*
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MEV / SEM	Microscopia eletrônica de varredura / *Scanning electron microscope*
min	Minutos
mL	Mililitros
mm	Milímetros
mM	Milimolar
MS	Espectrometria de massa
MS/MS	Espectrometria de Massa Tandem / *Tandem mass spectrometry*
MUC19	Mucina isoforma 19
MUC5B	Mucina oligomérica
n	Número
NaF	Fluoreto de sódio
nano-HPLC	nano-Cromatografia Líquida de Alta Performace/ High-performance liquid chromatography
NaOH	Hidróxido de sódio
NH4HCO3	Bicarbonato de amônio
nL	Nanolitro
nLc-ESI-MS/MS	Nano cromatografia líquida com ionização por eletrospray e espectrometria de massas sequencial *(Nano liquid Chromatography Electrospray Ionization tandem Mass Spectrometry)*
nm	Nanômetro
nº	Número
ºC	Grau Celsius

OSCN-	Íon hipotiocianato
PA / PAs	Película Aquirida / Películas Aquiridas
pH	Potencial hidrogeniônico
pI	Ponto isoelétrico
pI	Ponto isoelétrico
pIgR	Imunoglobulina polimérica
PM	Peso molecular
PMF	Impressão digital das massas de peptídeos / *Peptide Mass Fingerprint*
PMMA	Polimetilmetacrilato / *Polymetylmethacrylate*
pmol	Picomole
PRP / PRPs	Proteína rica em prolina(s)
PTPs	Proteínas tirosina fosfatases / *Protein tyrosine phosphatase*
Rainb12	Calmin
RIMS1	Regulating synaptic membrane exocytosis protein 1
rpm	Rotação por minuto
TFA	Ácido trifluoroacético
w/w	Peso/ peso (*weight /weight*)
WR	Reagente de trabalho / *Working Reagent*
α	Alfa

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 19

2 REVISÃO DE LITERATURA 25
2.1 Conceito de PA 27
2.2 Formação da PA 29
2.3 Composição da PA 33
2.3.1 O papel das proteínas da PA 38
2.4 Ultraestrutura da camada de película 42
2.5 Funções da PA 43
2.6 PA formada sobre esmalte e dentina em diferentes tempos e o seu papel protetor 45
2.7 Recentes abordagens proteômicas 49

3 PROPOSIÇÃO 53

4 MATERIAL E MÉTODOS 57
4.1 Seleção dos voluntários 59
4.2 Delineamento experimental 60
4.3 Preparação dos espécimes 60
4.3.1 Seleção e corte dos dentes humanos 60
4.3.2 Obtenção dos blocos de esmalte e dentina 60
4.3.3 Planificação dos blocos de esmalte e dentina humana 61
4.3.4 Preparação do dispositivo vestibular 62
4.4 Protocolo in situ para formação e coleta da PA 63
4.5 Preparação das amostras 65
4.5.1 Eluição das proteínas da PA por sonicação 65
4.5.2 Digestão em solução 66
4.5.3 Preparação para a quantificação de proteínas da PA 67
4.6 Análise em nLC-ESI-MS/MS 69
4.6.1 Identificação e caracterização de proteínas 70
4.7 Integração e quantificação proteômica 71

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO 73

6 CONCLUSÕES 139

REFERÊNCIAS 143

ANEXOS 157

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A película adquirida (PA) é um biofilme acelular, predominantemente proteico, com composição e propriedades únicas. Está presente sobre a superfície dentária através da adsorção seletiva de macromoléculas derivadas dos fluidos bucais sobre a superfície do esmalte dental (HANNIG, M.; JOINER, 2006; LENDENMANN; GROGAN; OPPENHEIM, 2000). Esta película é distinta do biofilme bucal, visto que este é constituído pelas proteínas da película, por células bacterianas e por matriz intercelular (NANCI, 2011). O termo “adquirida” indica a origem pós-eruptiva da película, que pode ser regenerada após a perda ou a remoção. Geralmente, a saliva é considerada como a principal fonte de constituição da película é composta de proteínas, lipídeos e glicoproteínas (HANNIG, M.; JOINER, 2006). Algumas proteínas adsorvem-se precocemente à superfície dentária, sendo reconhecidas como proteínas precursoras da película. Dentre elas encontram-se as proteínas ricas em prolina (PRPs), que estão entre as primeiras proteínas salivares a serem adsorvidas sobre a superfície do esmalte dentário, além de fosfoproteínas como histatina e estaterina, pela alta afinidade com a hidroxiapatita decorrente da interação iônica entre as proteínas salivares e a superfície do esmalte. Portanto, cada proteína tem um papel fundamental na função da película, sendo de grande importância a compreensão do papel deste filme orgânico, assim como a identificação, no mesmo, de possíveis biomarcadores para doenças bucais, como cárie e doença periodontal (HANNIG, M.; JOINER, 2006; HARA; ZERO, 2010; SIQUEIRA et al., 2007a; VITORINO et al., 2008; VITORINO et al., 2007).

O íntimo contato da PA com a superfície dentária confere a este filme inúmeras funções para a manutenção da integridade do dente (HANNIG; JOINER, 2006; SIQUEIRA et al., 2007a). A PA participa na lubrificação da estrutura dentária, protegendo-a do contato com dentes antagonistas, tecidos moles, alimentos abrasivos. Ainda, confere resistência à desmineralização para o esmalte e dentina, podendo auxiliar também na remineralização, prevenção do crescimento de cristais nas superfícies dos dentes e modulação a composição de colonizadores microbianos primários. Estas inúmeras funções da película justificam o grande interesse pelo conhecimento da composição desta película, nos âmbitos biológico e

clínico (ARMSTRONG, 1968; HANNIG, M.; JOINER, 2006; SIQUEIRA et al., 2007a; VITORINO et al., 2007). A película atua como uma barreira de difusão, com implicação na prevenção de cárie e erosão dentária, uma vez que afeta o transporte dos ácidos produzidos pelas bactérias ou de origem não bacteriana, respectivamente (BUZALAF; HANNAS; KATO, 2012).

Nos últimos anos, com o advento dos estudos proteômicos, tem havido um grande avanço no conhecimento da composição proteica da PA, assim como do impacto das diferentes proteínas encontradas na PA na prevenção da cárie e erosão dentária (LEE, Y.H. et al., 2013; SIQUEIRA et al., 2012; SIQUEIRA; CUSTODIO; MCDONALD, 2012; SIQUEIRA et al., 2007a; SIQUEIRA; OPPENHEIM, 2009; VITORINO et al., 2008; ZIMMERMAN et al., 2013). Entretanto, todos os trabalhos envolvendo esta ferramenta analítica até o momento focam na PA formada sobre o esmalte dentário. Sabendo-se que o esmalte e dentina são tecidos de origem e composição bastante diferente, especialmente devido ao alto conteúdo orgânico da dentina (NANCI, 2011) é esperado que a composição da PA formada sobre estes dois tecidos tenha composição diferente, o que nunca foi testado. Vários trabalhos têm focado no potencial protetor contra a erosão dentária da PA formada sobre o esmalte e a dentina, e os resultados indicam que o potencial protetor da PA é maior para o esmalte que para a dentina (HANNIG, M.; BALZ, 1999; HANNIG, M. et al., 2003; HARA et al., 2006; WETTON et al., 2006; WIEGAND et al., 2008). Estudos proteômicos em películas formadas sobre esmalte e dentina podem trazer importantes informações acerca das proteínas que estariam relacionadas à maior proteção contra a erosão da película formada sobre o esmalte, quando comparada àquela formada sobre a dentina.

O tempo de formação da PA também é importante quando se pensa no seu potencial protetor contra a desmineralização. Sabe-se que inicialmente há aderência de proteínas precursoras (primeiros 30 minutos de formação), as quais parecem conferir a maior proteção contra a desmineralização dentária, uma vez que se trata de uma camada bastante elétron-densa e as camadas subsequentes têm um arranjo muito mais frouxo quando comparado àquele das películas basais. Foi relatado 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 após 2 horas (HANNIG, M. et al., 2004). No segundo estágio de formação da película, chamado estágio maturacional (30-90 minutos após o início da

formação), ocorre um rápido aumento na espessura da película, o que, juntamente com a presença de estruturas globulares, sugere o envolvimento de agregados proteicos, mais do que proteínas individuais, no seu desenvolvimento (HANNIG, M.; BALZ, 2001). Entretanto, informações sobre as diferenças no conteúdo proteico nos distintos estágios de formação da PA empregando técnicas proteômicas são escassas (LEE, Y.H. et al., 2013)

Assim, diante do exposto, o conhecimento da composição proteica das películas formadas sobre diferentes substratos (esmalte e dentina), em diferentes estágios de formação, pode trazer informação importante acerca de qual(is) proteína(s) pode(m) ter um melhor papel protetor contra a desmineralização nas diferentes situações, o que pode ter um impacto no desenvolvimento de terapias de “engenharia de película”, visando ao enriquecimento de produtos odontológicos com as proteínas que possuírem melhor potencial protetor contra a desmineralização.

2 Revisão de Literatura

2 REVISÃO DE LITERATURA

Essa revisão de literatura apresentará de forma breve um conceito sobre a PA, sua composição e funções na cavidade bucal, com destaque para o seu papel protetor contra a desmineralização dentária. Serão ainda apresentadas as diferenças em relação à composição e papel protetor da PA formada sobre o esmalte e a dentina.

2.1 Conceito de PA

Em 1839, pela primeira vez, Alexander Nasmyth, descreveu a PA como um filme orgânico, que se apresentava como uma membrana delicada sobre a superfície do esmalte (NASMYTH, 1839). Esta membrana foi descrita como uma "cápsula dentária persistente" e por longo tempo acreditou-se que fosse de origem embriológica. A partir de 1930, começou-se a relatar que esta membrana de Nasmyth era depositada na superfície do esmalte por mediação de saliva [Korff (1930) apud (LENDENMANN; GROGAN; OPPENHEIM, 2000)]. Contudo, em 1949, Frank demonstrou claramente dois tipos de membrana de esmalte. Antes e imediatamente após a irrupção, os dentes são recobertos por um epitélio celular transitório, que é sucedido por uma estrutura amorfa. Ambas podem ser deslocadas da superfície do esmalte por tratamento ácido. A membrana amorfa também pode ser encontrada sobre dentes abrasionados, o que indica que não é de origem embriológica (FRANK, 1949 apud (LENDENMANN; GROGAN; OPPENHEIM, 2000). O termo "PA" foi descrito pela primeira vez por Colin Dawes, em 1963, em uma revisão sobre os tegumentos da superfície do esmalte. O autor sugeriu a separação das várias estruturas orgânicas que recobrem os dentes em duas categorias: aquelas de origem embriológica e aquelas adquiridas após a irrupção dentária. Desde então criou-se consenso de que os tegumentos de origem embriológica são perdidos após a irrupção dos dentes, sendo substituídos por uma membrana acelular, livre de bactérias, chamada PA (DAWES; JENKINS; TONGE, 1963).

A natureza e origem PA foram investigadas por Meckel, (1965). O autor sugeriu que a origem poderia ser decorrente de acumulações sucessivas de cutículas na superfície ou ainda a derivação a partir de uma camada de biofilme

antigo desnaturado, que poderia se formar devido à lise das bactérias (MECKEL, 1965). Em 1968, Armstrong evidenciou em seu trabalho que a PA é um complexo de matriz mucoproteinácea salivar, de origem da glândula submandibular, associado a elementos da parede celular bacteriana e material bacteriano lisado. A película orgânica que é formada na interface entre os dentes e o ambiente salivar é importante, sendo de interesse biológico e clínico (ARMSTRONG, 1968).

A PA foi apresentada como um filme orgânico que recobre todas as superfícies dos dentes, somente em meados do século XX. Nesta época tornou-se claro que esta membrana se forma após a irrupção dentária, daí o nome película "adquirida". A estrutura da PA é influenciada por fatores como a composição da microbiota bucal, propriedades químicas e físicas da superfície do dente, diferentes locais de formação, além dos ciclos circadianos e as capacidades proteolíticas do ambiente bucal (LENDENMANN; GROGAN; OPPENHEIM, 2000). Compõe-se de proteínas e outras macromoléculas (lipídeos e glicoproteínas) adsorvidas à superfície dentária a partir do ambiente bucal (saliva e fluido gengival), podendo ser distinguida do biofilme bacteriano. Reveste-se de grande importância fisiológica e fisiopatológica para todas as interações que ocorrem na interface dente-saliva, estando relacionada com os eventos de des e remineralização, lubrificação das superfícies dentárias e aderência bacteriana (HANNIG, M.; JOINER, 2006). É importante para a manutenção da integridade dos tecidos bucais e fornece pistas sobre doenças e condições locais e sistêmicas (AMADO et al., 2005).

Segundo o conceito atual, a PA é um filme acelular, com cerca de 10 µm de espessura, formado por proteínas, carboidratos e lipídeos de origem salivar que se adsorvem sobre a superfície do esmalte logo após a irrupção. Tem um importante papel na manutenção da integridade da superfície dentária, por auxiliar na remineralização, proteger contra a desmineralização e possuir atividade antimicrobiana (SIQUEIRA; CUSTODIO; MCDONALD, 2012; SIQUEIRA et al., 2007b). A película é continuamente reformulada durante o ciclo de vida do dente (FEATHERSTONE; LUSSI, 2006), sendo que sua composição pode ser modificada pela interação entre a saliva, a dieta do indivíduo e a estrutura do dente (HARA; ZERO, 2010).

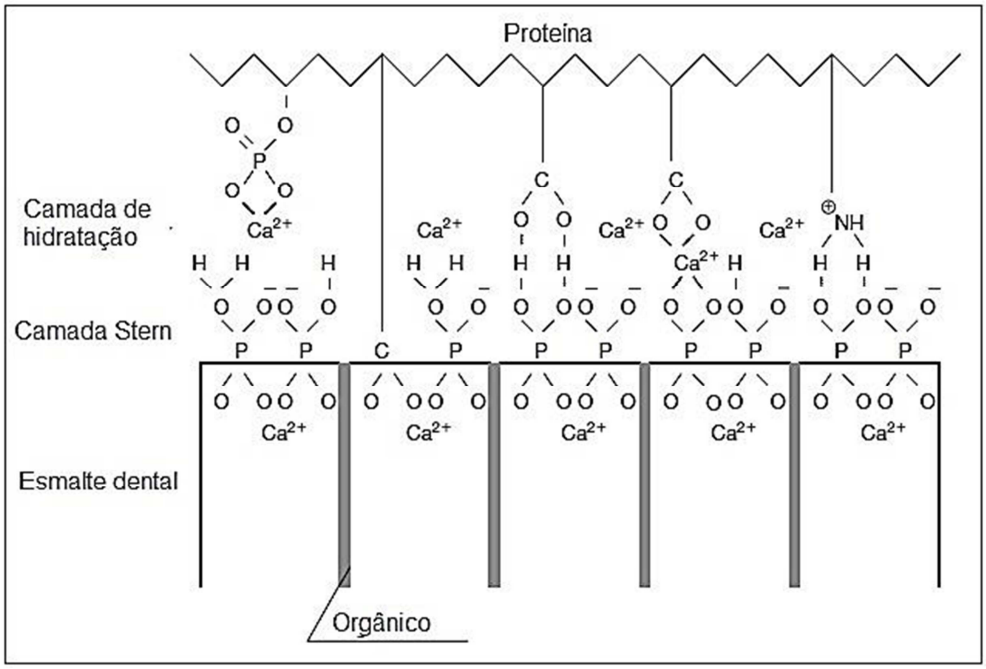
2.2 Formação da PA

A PA forma-se rapidamente, pela adsorção de proteínas à superfície dentária, logo após a exposição à saliva. A saliva é secretada por várias glândulas salivares, tanto as maiores como as sublinguais, submandibulares e parótidas, como as menores, que produzem saliva com composição e características específicas. Durante o dia, a contribuição das glândulas salivares pode variar dependendo do estímulo aplicado, o que resulta em alteração na secreção de fluido e na composição das proteínas. O fluxo salivar é um processo contínuo e estimulado por estímulos gustatórios e mecânicos.

A secreção salivar é constituída de 99% de água, e contém cerca de 2 g/L de proteínas. As glândulas salivares são as únicas glândulas exócrinas do trato digestivo, cuja atividade secretora é exclusivamente controlada pelo sistema nervoso autônomo (simpático e parassimpático). No momento de repouso (sem estímulo externo), o fluxo salivar é aproximadamente 0,5 mL por minuto, na maioria dos adultos. É o resultado da estimulação autonômica de baixo nível dos centros superiores, incluindo o córtex orbitofrontal e amígdala cerebral, para trabalhar através dos centros salivares dentro de núcleos do trato solitário no tronco cerebral, para agir sobre as glândulas salivares. A estimulação simpática induz a liberação de proteína das glândulas parótida e submandibular e a estimulação parassimpática induz a liberação de proteínas da glândula sublingual. No momento de estresse, os centros superiores reduzem o tráfego de nervos para os centros salivares e, em seguida, para as glândulas salivares, o que provoca a sensação de boca seca (CARPENTER, 2013; TURNER; SUGIYA, 2002)

Todos os desequilíbrios diários sobre o sistema colinérgico e adrenérgico, ou condições exógenas como uso de medicamentos, radiação e ingestão de alimentos, vão produzir mudanças no fluxo salivar e/ou na composição da saliva. No caso de ingestão de alimentos com baixo pH, haverá um aumento do fluxo salivar, sendo produzida uma saliva rica em bicarbonato para diluir o ácido e tamponar o ambiente bucal. Sabe-se que a saliva é um importante fluido corpóreo, com papel essencial na homeostasia, protegendo contra patologias extrínsecas, o que contribui para a saúde bucal (SUWABE; FUKAMI; BRADLEY, 2008).

A saliva tem um papel primordial no processo de formação da PA. Devido à sua atividade na superfície dentária, a adsorção de proteínas salivares implica na formação da película. O processo, em esmalte, inicia-se em poucos segundos, e ocorre um rápido aumento da espessura da película, atingindo de 10 a 20 nanômetros dentro de alguns minutos, permanecendo estável por cerca de 30 minutos (LENDENMANN; GROGAN; OPPENHEIM, 2000). Este processo ocorre pelo contato de eletrólise da solução aquosa da saliva. Os íons cálcio dos cristais do esmalte têm uma maior tendência de se dissolver na saliva do que os íons fosfato. Como resultado, o íon fosfato remanescente confere à superfície de esmalte carga global negativa. Esta superfície será revestida com uma camada de carga positiva de íons cálcio. Sendo assim, as proteínas salivares são adsorvidas ao esmalte devido às interações eletrostáticas com a camada iônica de cálcio e fosfato, como apresentado na Figura 1 (MORENO; KRESAK; HAY, 1982).



Fonte: HANNIG; JOINER, 2006

Figura 1 - Desenho esquemático de formação de película.

As primeiras proteínas a se ligarem ao esmalte dentário são conhecidas como “proteínas precursoras”, que exibem alta afinidade pela hidroxiapatita. Derivam de secreções glandulares e não glandulares que são componentes da saliva total. Dentre as proteínas precursoras encontram-se as histatinas, estaterinas e proteínas ricas em prolina (PRPs), que têm alta afinidade pela hidroxiapatita, decorrente das

interações eletrostáticas, o que facilita a adsorção à superfície do esmalte e são capazes de reações de troca com os íons fosfato do esmalte, como descrito *in vitro* (HAY, 1973; LAMKIN et al., 2001; SCHUPBACH et al., 2001; STIEFEL, 1976).

Contudo, considerando o fato da ampla variedade de proteínas distintas, na camada de película formada em curto prazo, é improvável que apenas interações iônicas contribuam para a adsorção de proteínas. Existem diferentes tipos de adsorção proteica, como as interações de superfície, nas quais os aminoácidos têm em suas cadeias laterais propriedades hidrofóbicas. As interações hidrofóbicas são consideradas uma das principais de forças de condução para a adsorção de proteínas. A base desta interação é que moléculas da água se esforçam para evitar componentes não polares presentes ao seu redor. As moléculas de água perto de uma superfície hidrofóbica são mais ordenadas, em solução, e, portanto, têm menor entropia. Após a adsorção de uma proteína a partir da solução, a água será libertada do substrato hidrofóbico bem como a partir de grupos hidrofóbicos da proteína, o que irá resultar em aumento da entropia e, portanto, na força motriz para a adsorção. A interação eletrostática depende da taxa de proteína e do substrato, da repulsão entre as cargas semelhantes e da atração entre as cargas opostas. As proteínas são capazes de se adaptarem estruturalmente para minimizar a repulsão de carga com a superfície, e se adsorverem através dos aminoácidos que são eletrostaticamente atraídos para a superfície. A entropia conformacional está envolvida com a estrutura tridimensional de proteínas, o que pode ser um indicativo de que as proteínas mediante a adsorção podem aumentar ou diminuir a entropia conformacional. Isto é visto, em geral na adsorção de proteínas maiores, estruturalmente menos estáveis (SVENDSEN, 2009). Outras forças tais como interações de Van der Waals também contribuem para adsorção de proteínas sobre a superfície do esmalte e interações hidrofóbicas têm sido sugeridas para desempenhar um papel na formação da camada da película. Essas últimas interações são iniciadas termodinamicamente, como resultado de um ganho na entropia, que ocorre quando uma proteína adsorvente substitui a molécula de água na superfície (HANNIG, M.; JOINER, 2006).

No segundo momento de formação da película, considerado estágio maturacional, é caracterizado por uma adsorção contínua de biopolímeros de saliva e ocorre um rápido aumento na sua espessura atingindo um *plateau*, entre 30 a 90 minutos, com espessura de 100 a 1000 nm. Sua espessura depende da localização

na cavidade bucal, sendo mais espessa na região vestibular do que na lingual. Nesta fase, a PA é formada pela presença de estruturas globulares, cujo interior possui cargas hidrofóbicas e superfície carregada negativamente, semelhante às micelas (RØLLA; RYKKE, 1994; (HANNIG, M.; BALZ, 2001)

A película ainda pode sofrer maturação intrínseca e extrínseca, o que pode afetar a sua solubilidade (SIQUEIRA; CUSTODIO; MCDONALD, 2012). A maturação intrínseca pode ser causada pela presença de transglutaminase, derivada de células epiteliais bucais, que pode fazer ligações cruzadas entre as PRPs básicas e a estaterina bem como pela presença de fosfatase alcalina. De fato, as ligações cruzadas enzimáticas e a desfosforilação parecem ser os eventos mais importantes para a maturação intrínseca da película, enquanto que a proteólise parece ser menos importante (HANNIG, C. et al., 2008; YAO; LAMKIN; OPPENHEIM, 2000)

Já a proteólise salivar, que pode ocorrer antes (HELMERHORST et al., 2006) ou após a adsorção à hidroxiapatita (MCDONALD et al., 2011), desempenha um importante papel na maturação extrínseca da película, já que muitos dos seus componentes são fragmentos peptídicos (SIQUEIRA; OPPENHEIM, 2009; VITORINO et al., 2007). A formação e maturação da película também podem ser influenciadas por fatores extrínsecos, como produtos de clareamento dentário, dentifrícios abrasivos e ingestão de alimentos e bebidas ácidos (HARA; ZERO, 2010). Em relação à contribuição as diferentes glândulas salivares, um estudo *in vitro* em esmalte dentário identificou amilase, PRPs glicosiladas e acídicas e estaterinas, como as principais proteínas da película derivadas da glândula da parótida. As proteínas originadas da glândula submandibular foram semelhantes às da glândula parótida, exceto pela ausência de PRPs glicosiladas e proteína rica em prolina glicosilada e presença da cistatina (JENSEN; LAMKIN; OPPENHEIM, 1992).

As proteínas da película se aderem ao esmalte e às superfícies de hidroxiapatita de forma altamente seletiva. Um estudo *in vitro* investigou a adsorção das proteínas sobre as superfícies de hidroxiapatita expostas à saliva em função do tempo. Pelo menos 3 padrões de adsorção foram observados. A amilase adsorve-se rapidamente, com cerca de 67% do seu conteúdo total adsorvido no primeiro minuto, sendo que padrão similar foi observado para as PRPs glicosiladas, com 80% de adsorção no primeiro minuto. A adsorção máxima de amilase e PRPs glicosiladas aconteceram entre 30 e 60 minutos. Já a PRP-1 e a PRP-2 apresentou um padrão mais complexo de adsorção, com uma explosão na adsorção de 20% no primeiro

minuto, seguindo por uma adsorção mais lenta ao longo das 2 horas seguintes. Em contraste, a PRP-3, a PRP-4 e a estaterina apresentaram rápida adsorção já no primeiro minuto. Um padrão de adsorção bifásico foi observado para a histatina, com aproximadamente 25% de adsorção no primeiro minuto e 75% adsorvendo-se lentamente durante as 2 horas subsequentes. A ligação de *Streptococcus mutans* e *Actinomyces viscosus* a PRP-1 e PRP-2 é bastante aumentada após a adsorção destas proteínas à superfície do esmalte. Uma vez que foi observado que a PRP-1 e a PRP-2 se ligam à hidroxiapatita de maneira bifásica, com a maioria da ligação acontecendo lentamente, a colonização precoce das superfícies dentárias pelos *S. mutans* e *A. viscosus* parece ser dependente da presença de um conteúdo crítico de PRP-1 e PRP-2 (LAMKIN; ARANCILLO; OPPENHEIM, 1996). Outro estudo *in vivo* com amostra de películas formadas em 5 minutos e 120 minutos, proteínas com grande afinidade com a hidroxiapatita, como a α-amilase, a anidrase carbônica 6 e cistatina, mostraram-se em maior número do que quando comparado ao tempo de 120 minutos. Esses dados demonstram a alta seletividade do processo de formação da PA (SIQUEIRA; CUSTODIO; MCDONALD, 2012). A camada de película formada *in situ*, em períodos de 30 a 120 minutos revela uma superfície globular com diâmetros das estruturas adsorvidas semelhantes a glóbulos, variando entre 80 e 200 nm. Tais observações também indicam em que a formação da película *in vivo* é causada principalmente por adsorção de agregados proteicos ao invés de biopolímeros salivares individuais (HANNIG, M.; JOINER, 2006).

2.3 Composição da PA

A PA é composta principalmente por glicoproteínas salivares, mas contêm ainda proteínas de outras fontes, como fluido gengival, dieta e epitélio bucal (HANNIG, M.; JOINER, 2006). Esses componentes orgânicos têm grande afinidade com a superfície do esmalte e rapidamente se adsorvem na área limpa, após a escovação dos dentes ou profilaxia. A adsorção ocorre em duas etapas: incialmente há a adsorção de poucas proteínas nas regiões hidrofóbicas do dente por interações eletrostáticas, deixando as partes hidrofóbicas das moléculas proteicas expostas à superfície. Na sequência, os agregados proteicos ou estruturas semelhantes a micelas podem se adsorver aos sítios da superfície dentária não recoberta, além de

interagirem com a camada proteica hidrofóbica inicialmente formada. Este padrão específico de adsorção parece ser responsável pela morfologia globular da PA (HARA; ZERO, 2010).

A composição e as propriedades da PA, só podem ser analisadas a partir da coleta do material. Estes estudos são dificultados pela quantidade obtida a partir da superfície do esmalte. Foi observado que a PA formada *in vivo* na superfície vestibular de um dente, no período de 120 minutos, contém aproximadamente 1 grama de proteína (YAO et al., 2001). Na década de 1970, ainda pela limitação de técnicas a serem utilizadas para a coleta da PA, os estudos não demonstravam a variação de composição de película formada em diferentes áreas da cavidade bucal (RYKKE; SONJU; ROLLA, 1990; SONJU; ROLLA, 1973). Contudo, mais tarde, estudos demonstraram a existência de diferentes composições da PA e entre as várias regiões da estrutura dentária, devido à disponibilidade de macromoléculas do meio ambiente bucal. Vários estudos foram realizados para determinar a composição da PA, um grande número de proteínas e glicoproteínas formadas na PA *in vivo* foram identificadas previamente (AL-HASHIMI; LEVINE, 1989; ARMSTRONG, 1967; SONJU; ROLLA, 1973; YAO et al., 2001) tais como, as proteínas precursoras, histatinas, glucosiltransferase, anidrase carbônica I, II, VI, mucina, cistatina e enzimas como α–amilase, lisoenzima e lactoferrina. Também foram descritos componentes do plasma sanguíneo, como fibrinogênio, fibronectina, albumina, imunoglobulinas (IgA, IgM, IgG), fator de complemento (C3), além de queratinas 13 e 15. O aumento do fluido gengival nos casos de gengivite afeta diretamente a formação da PA e provoca um aumento das proteínas plasmáticas. Na PA também estão presentes vários tipos de carboidratos, como glicose, galactose, manose e frutose. Ainda é discutida qual a origem da glicose na película. A hipótese menos provável seria a partir de glicoproteínas salivares, e a mais provável seria a adsorção direta de polímeros da glicose de origem bacteriana (MAYHALL; BUTLER, 1976; SONJU, 1975). Deste modo, os biopolímeros disponíveis na saliva são importantes na formação e composição da película.

Diferentes modelos experimentais são utilizados para estudar a composição da PA, tais como modelos *in vitro, in situ* e *in vivo*. Os estudos *in vitro,* apesar de não apresentarem as condições dinâmicas da cavidade bucal, como o fluxo salivar, fornecem informações sobre a afinidade e interações entre a hidroxiapatita e as proteínas, além de permitirem avaliação da atividade enzimática. Algumas das

proteínas vistas nesses estudos são: estaterina e PRPs, amilase, IgA, cistatina, lisoenzima e anidrase carbônica VI (HAY, 1973; LAMKIN et al., 2001; SCHUPBACH et al., 2001; SIQUEIRA; CUSTODIO; MCDONALD, 2012; SIQUEIRA et al., 2007a; STIEFEL, 1976). Em estudos *in situ*, onde blocos de dentes bovino e humano são inseridos na cavidade bucal, foi confirmada a presença de histatina, estaterina, PRPs, mucinas, amilase, cistatinas, lisozima, lactoferrina, anidrase carbônica, peroxidase, imunoglobulinas, aglutinina e glicotransferase, utilizando diferentes técnicas de combinação de aminoácidos, imunogênicas, histológicas, cromatográficas e eletroforese (HANNIG, M.; JOINER, 2006; VACCA SMITH; BOWEN, 2000).

O conhecimento da composição da PA sem dúvida ganhou corpo quando passaram a ser empregadas técnicas proteômicas para sua elucidação, ao invés das técnicas enzimáticas ou imunológicas, que eram empregadas anteriormente (SIQUEIRA; CUSTODIO; MCDONALD, 2012). Isto se deve à alta sensibilidade das técnicas proteômicas, e ao fato de que estas permitem que sejam identificadas muitas proteínas ao mesmo tempo. No entanto, o número de trabalhos existentes na literatura empregando esta ferramenta analítica ainda é pequeno, de forma que há muito a ser estudado.

Utilizando a LC-ESI-MS/MS (*Liquid Chromatography - ElectroSpray Ionization tandem Mass Spectrometry* / Cromatografia Líquida Ionização por Eletrospray espectrometria de massas sequencial), um total de 130 proteínas diferentes foi identificado na PA formada *in vivo* no esmalte dentário, sendo que 89 destas puderam ser identificadas em pelo menos 3 experimentos (SIQUEIRA et al., 2007b). Entre as proteínas identificadas, somente 14,4% eram originárias das glândulas salivares exócrinas, enquanto 67,8% eram derivadas de células e 17,8% do soro sanguíneo, vindo por meio do fluido gengival. Se estas proteínas forem agrupadas com base no seu possível papel na formação da PA, as mesmas podem ser separadas em 3 grandes grupos: proteínas que têm habilidade de se ligarem a íons cálcio (17,5%), aquelas que mostram uma alta tendência de se ligarem a íons fosfato (15,4%), as quais devem formar a primeira camada de proteínas que se adsorvem à superfície do esmalte e, finalmente, aquelas que são capazes de interagir com outras proteínas (28,2%). As últimas estão provavelmente envolvidas na formação de camadas proteicas sucessivas por interagirem com outras proteínas diretamente adsorvidas à superfície do esmalte. Em relação à sua função biológica,

as proteínas identificadas estão envolvidas na resposta inflamatória (12,5%), na defesa antimicrobiana (8,3%) ou na resposta imune (11,3%), na lubrificação (<1%), e capacidades tampão (<1%) e remineralizante (15,5%).

Um outro estudo *in vivo* propôs uma estratégia para a caracterização do peptidoma da PA do esmalte humano baseada na extração sequencial com guanidina e ácido trifluoroacético, seguida por identificação por MALDI-TOF/TOF (*Matrix- assisted laser desorption ionization- time of flight* / Dessorção a Laser Assistida por Matriz – tempo de vôo) (VITORINO et al., 2008). Como resultado, mais de 90 proteínas/peptídeos foram identificados. A maior parte das identificações correspondeu a fragmentos de peptídeos/proteínas salivares, pertencentes às classes de PRPs ácidas, básicas, estaterina, cistatinas S e SN e histatina 1, que também foi identirficada na forma intacta. Os resultados mostraram que os peptídeos com grupos acídicos estavam enriquecidos na fração do ácido trifluoroacético, enquanto os peptídeos com grupos não acídicos ou fosfato estavam prevalente no extrato de guanidina. Os fragmentos presentes na PA mostraram uma predominância de pontos de clivagem localizados em resíduos de arginina, tirosina e lisina. Os dados obtidos sugerem a atividade proteolítica poderia influenciar a formação e composição da PA do esmalte.

Em um estudo proteômico subsequente, foram identificadas pequenas proteínas e peptídeos presentes na PA. Para tal, a PA coletada de 10 voluntários foi submetida à filtração centrífuga utilizando uma membrana de corte de peso molecular de 10 kDa e cromatografia de filtração em gel de alta resolução. As frações contendo peptídeos com menos de 10 kDa foram coletadas utilizando uma membrana de exclusão de 10 kDa e analisadas por LC-ESI-MS/MS. Foram identificados 70 peptídeos naturais da película, com peso molecular variando entre 767 e 3981 Da, originados de 29 proteínas diferentes. Acredita-se que a presença destes peptídeos pequenos na película seja importante, uma vez que estudos estruturais e funcionais têm revelado que domínios específicos das proteínas nativas possuem atividades biológicas aumentadas (SIQUEIRA; OPPENHEIM, 2009).

O estudo de Siqueira et al. (2010), empregando técnicas proteômicas (gel catiônico seguido por MALDI-TOF), demonstrou a presença de histatinas intactas na PA do esmalte formada *in vivo.* Os autores ainda comprovaram, através de protocolo *in vitro,* que as histatinas de ocorrência natural na PA do esmalte têm potencial para fornecer algum grau de proteção contra desafios ácidos (SIQUEIRA et al., 2010)

Recentemente, tem sido avaliado, empregando ferramentas proteômicas, se o tratamento da superfície do esmalte ou de discos de hidroxiapatita com fluoreto é capaz de alterar a composição da PA formada sobre estas superfícies (MASSON et al., 2013; SIQUEIRA et al., 2012). No trabalho de SIQUEIRA et al. (2012), discos de hidroxiapatita foram expostos a água deionizada (controle) ou solução de fluoreto de sódio (1, 2 ou 5%) por 2 horas, com subsequente exposição a saliva humana por mais 2 horas para formação da película adquirida, que foi coletada e submetida a ESI-MS/MS *(Electrospray tandem mass spectrometry*/ Espectrometria de massas com ionização por eletrospray) para identificação, caracterização e quantificação das proteínas. Observaram-se 45 proteínas presentes nos 4 grupos, 12 exclusivamente presentes no grupo controle e outras 19 exclusivamente presentes no grupo tratado com NaF 5%. Foi relatado ainda que a concentração de importantes proteínas salivares, como estaterina e histatina 1 diminuíram em função dos níveis crescentes de fluoreto, sugerindo que estas proteínas são repelidas quando a superfície da hidroxiapatita é recoberta com fluoreto. Os autores concluíram que o tratamento com fluoreto em alta concentração modula tanto qualitativa quanto quantitativamente a formação da película, efeito que pode ter impacto na subsequente formação do biofilme bacteriano. Já no estudo de MASSON et al. (2013), foi feito tratamento com fluoreto, na forma de fluorfosfato acidulado (APF), sobre blocos de esmalte bovino por 4 minutos, com subsequente formação da PA por imersão em saliva humana por 2 horas. No grupo controle negativo foi feito tratamento com água deionizada e no grupo controle positivo, tratamento solução de ácido fosfórico. As proteínas adsorvidas foram extraídas e analisadas por LC-MS/MS. Foram identificadas 56 proteínas, sendo 12 exclusivas do grupo tratado com APF e 11 exclusivas do grupo tratado com ácido fosfórico. O tratamento com APF diminuiu a concentração de histatina 1, como relatado no trabalho de SIQUEIRA et al. (2012).

Também têm sido estudada a composição da PA formada sobre dentes decíduos (ZIMMERMAN et al., 2013). Foi coletada película de 10 crianças (com idade entre 18 e 54 meses), que foi analisada por LC-ESI-MS/MS. Foram identificadas ao todo 76 proteínas, além de 38 peptídeos, sugerindo que a PA do esmalte de dentes decíduos tem um proteoma/peptidoma único.

Alterações qualitativas e quantitativas na composição proteica ao longo do tempo (5 minutos, 10 minutos, 60 minutos e 120 minutos) da PA do esmalte formada *in vivo* foram examinadas recentemente, empregando espectrometria de massas

quantitativa (LEE, Y.H. et al., 2013). Cinquenta proteínas foram identificadas em todos os tempos de formação da película, as quais foram submetidas a quantificação proteômica relativa. A abundância de importantes proteínas salivares, como histatina 1, diminui com o aumento do tempo de formação, enquanto outras proteínas essenciais, como a estaterina teve abundância relativa constante em todos os tempos.

A quantidade e composição da saliva são afetadas pelo tipo de estímulo para secreção salivar. A glândula parótida normalmente contribui com cerca de 60% do volume total de saliva quando estimulada, secreta uma secreção serosa, que contem mucina, além de PRPs e α-amilase. Já as glândulas menores (labiais, bucais, palatinas, glossopalatinas e linguais) embora contribuem cerca de 10 % do volume de saliva, também são importantes por secretar uma camada de proteínas ricas em mucinas à mucosa adjacente (CARPENTER, 2013). Pouco se sabe acerca da composição proteica da saliva estimulada por estímulos gustativos. Tem sido relatado que o tipo de estímulo gustativo é capaz de alterar a expressão proteica na saliva. Foi observado, utilizando ferramentas proteômicas, que na saliva total o número de proteínas afetadas é maior quando o estímulo é feito com sabor ácido, seguido pelo azedo, e finalmente pelo doce (NEYRAUD et al., 2006). Recentemente, o perfil proteico em PAs formadas *in vivo* sobre esmalte humano em condições de repouso, e após estimulação salivar mecânica e química foi avaliado qualitativa e quantitativamente (LC-ESI-MS/MS). Ao todo, foram detectados 115 proteínas/peptídeos, sendo que 51 proteínas apareceram nos 3 grupos. A concentração proteica foi maior nos grupos em que houve estimulação salivar, o que pode resultar numa maior proteção para o esmalte dentário (SANTOS, 2013).

2.3.1 O papel das proteínas da PA

As proteínas são os componentes mais abundantes e importantes da saliva, derivando de diferentes secreções glandulares (parótidas, submandibulares, linguais e glândulas menores) e não glandulares (sangue, mucosa, epitélio bucal e fluido crevivular).

As **PRPs** são conhecidas como “precursoras da formação da PA”, pela sua grande afinidade com o esmalte dentário, decorrente de suas interações eletrostáticas (HANNIG, M.; JOINER, 2006). As **PPRs básicas** parecem ser

exclusivas das glândulas parótidas, enquanto as **PPRs ácidas** são originadas das glândulas submandibular e parótida. As PRPs são altamente polimórficas, e, embora codificadas por somente seis genes, mais de 50 proteínas diferentes existem, principalmente por causa do rearranjo dos genes, e também devido ao processamento pós-secreção (HAY et al., 1988). As PRPs têm como função formar uma cobertura orgânica sobre a superfície do dente e das mucosas e conferem lubrificação, favorecem a mastigação e deglutição. Além disso, inibem a deposição de cristais na superfície do esmalte (HAY; MORENO, 1979).

Outra proteína muito importante para a PA é a **estaterina**, em termos de propriedades físicas. Seu nome deriva do grego "*Statheropio*", que significa estabilizar, e é secretada pelas glândulas parótida e submandibular. Tem por função conferir lubrificação no ambiente bucal, e também a inibição do crescimento de cristais, tanto inibindo a precipitação espontânea de fosfato de cálcio, precipitação primária; quanto o crescimento do cristal, precipitação secundária. A estaterina também adsorve à hidroxiapatita, facilitando a aderência de algumas bactérias, como *Actinomyces viscosus* e *Fusobacterium nucleatum* (HELMERHORST; OPPENHEIM, 2007; JENSEN et al., 1991)

Outro grande grupo de proteínas que compõe a PA são as **mucinas** que são secretadas pelas glândulas submandibulares e sublinguais. As mucinas são glicoproteínas, com elevado peso molecular, que contribuem significativamente no comportamento viscoelástico da saliva. Têm função de lubrificação e hidratação, revestindo os tecidos duros e moles da cavidade bucal. Em adição, têm efeito protetor contra a erosão do esmalte, além de conferir proteção mecânica e antimicrobiana (BUZALAF; HANNAS; KATO, 2012; CARPENTER, 2013; TABAK, 1990).

As **histatinas** pertencem a uma família de peptídeos básicos ricos em **histidinas** que se encontram na saliva humana (OPPENHEIM et al., 1988). Estas são consideradas também como precursores da formação da PA, sendo originadas da glândula submandibular. Exibem atividades antibacterianas e antifúngicas contra *Cândida albicans* e *Cryptococcus neoformans*. O efeito antimicrobiano do histatina 5 é devido à sua composição de múltiplos resíduos de aminoácidos básicos arginina e lisina. Essas proteínas atuam na membrana celular da bactéria, formando poros, resultando na perda da seletividade e isto resulta na morte bacteriana.

As **cistatinas** são proteínas secretadas pelas glândulas submandibular e sublingual. São proteínas de baixo peso molecular, divididas em 6 grupos (A, C, D, S, AS e SN), resistentes à degradação enzimática e atuam como inibidores específicos das cisteína-proteinases e antimicrobianas. Os níveis de cistatina são maiores em pacientes com periodontite crônica (tipo C), enquanto que os pacientes que apresentam a cavidade bucal saudável apresentam o tipo S (LAMKIN et al., 1991; SIQUEIRA; CUSTODIO; MCDONALD, 2012; SIQUEIRA et al., 2007b).

Outra importante proteína é a **anexina**, do grego *"trazer/aderir junto" (bring/ hold together)*. A propriedade principal desta proteína deve-se a sua ligação aos fosfolipídeos das membranas biológicas e têm as propriedades de regulação de correntes iônicas de Ca^{+2} (GERKE; MOSS, 2002).

A **anidrase carbônica** VI é secretada pelas glândulas salivares das células acinares serosas. Tem a função de proteger os dentes da cárie através de mecanismo relacionado à capacidade tampão. A anidrase carbônica acumula-se à película e mantém sua atividade enzimática. Em geral, a anidrase carbônica catalisa a reação reversível $CO_2 + H_2O \leftrightarrow HCO_3^- + H^+$, deste modo, acelera a neutralização do ácido contribuindo para a proteção contra a desmineralização (LEINONEN et al., 1999).

Outro grupo de proteínas conhecidas são as proteínas salivares ricas em aminoácidos aromáticos. Dentre elas, a **lactoferrina**, que origina-se da saliva total. Possui um alto peso molecular, e um núcleo porfirínico, que está ligado ao transporte de íons de ferro na saliva, sendo que cada molécula se liga a 2 íons de ferro. Tem um importante papel antimicrobiano, inclusive contra os *Streptococcus mutans*, que necessitam de ferro para seu crescimento (OTTO, 2011).

As enzimas salivares têm atividade catalítica, degradando os componentes salivares, tornando-os adequados para a absorção. (HANNIG, C.; HANNIG; ATTIN, 2005). A enzima mais abundante é a **alfa-amilase**, que hidrolisa as ligações glicosídicas α-1-4 de polissacarídeo do amido e glicogênio. Liga-se seletivamente com várias espécies de estreptococos, como *S. sanguis*, *S. gordonii, S. mitis, S. parasanguis, S. christa e S. salivarius,* facilitando a aderência na superfície dentária. Algumas bactérias produzem proteínas ligadoras de amilase, como o *S. gordonii*. Em adição, a alfa-amilase forma complexo com a glicosiltransferase na presença da proteína ligadora de amilase, podendo influenciar na ecologia de biofilmes bucais

durante a fase inicial de colonização da superfície dentária (HANNIG, C. et al., 2004).

A **lisozima** é uma enzima secretada pelas glândulas submandibulares e sublinguais com carga positiva encontrada em abundância na saliva. Têm como principais funções interagir com outras proteínas, auxiliando na formação de proteínas aglomeradas na PA, além disso, atua como componente antibacteriano (HANNIG, C.; SPITZMULLER; HANNIG, 2009; SIQUEIRA; CUSTODIO; MCDONALD, 2012; SIQUEIRA et al., 2007b).

A **lactoperoxidase** é uma enzima de alto peso molecular, contendo um anel de porfirina e ferro como cofator. Origina-se a partir da glândula parótida. Na saliva, a lactoperoxidase utiliza particularmente o íon tiocianato como substrato em presença do peróxido de hidrogênio, e os produtos liberados desta reação, em especial o íon hipotiocianato (OSCN-), são capazes de oxidar compostos importantes, como por exemplo, os grupamentos tióis de proteínas existentes nas células bacterianas, tornando-as inativas. Desta forma, a lactoperoxidase exerce também uma ação antibacteriana (OTTO, 2011; (HANNIG, C.; HANNIG; ATTIN, 2005).

As **imunoglobulinas** são glicoproteínas presentes no plasma sanguíneo, derivadas da saliva total, cuja principal função é a defesa contra invasores do organismo. Essas proteínas são quimicamente heterogêneas e apresentam propriedades de se combinarem aos antígenos. As imunoglobulinas secretórias apresentam a primeira linha de defesa do organismo, formam macromoléculas, e impedem a aderência às superfícies das mucosas, facilitando a remoção pela deglutição Dentre estas, a imunoglobulina A (IgA), representa 60% do total de imunoglobulina na saliva, sendo sintetizada por células plasmática das glândulas salivares. É ativamente transportada através da proteína receptora de imunoglobulina polimérica (pIgR). A IgA é endocitada pela célula, e mantida dentro de uma vesícula e transportada para o citoplasma da célula até a membrana apical, onde o receptor é clivado para liberar a IgA (CARPENTER, 2013; ORSTAVIK; KRAUS, 1974).

2.4 Ultraestrutura da camada de película

Os estudos de ultraestrutura indicam que a película consiste em frações livres e firmemente consolidadas de proteínas, que estão ligadas à superfície do esmalte com diferentes forças de ligação (VASSILAKOS; ARNEBRANT; GLANTZ, 1993; VASSILAKOS et al., 1992). Os estudos convencionais acerca da ultraestrutura da película são conduzidos empregando-se microscopia eletrônica de varredura (MEV) e transmissão (MET). Alguns estudos com MET mostram que a PA é descrita como um revestimento de superfície homogênea e amorfa isenta de bactérias. A PA formada em 2 horas possui espessura de 100 a 500 nm, com revestimento orgânico irregular e incompleto. Depois de longos períodos de várias horas a até dias, a PA apresenta forma mais compacta. Sua espessura varia de acordo com o sítio de formação na cavidade bucal. A PA formada em 24 horas em área palatal tem espessura de 100 – 200 nm, e em área vestibular de 1000 – 1300 nm. (HANNIG, M.; JOINER, 2006; SIQUEIRA; CUSTODIO; MCDONALD, 2012).

Estudos utilizando a microscopia eletrônica de varredura *(*SEM - *Scanning Electron Microscopy*) e microscopia de força atômica (AFM) indicam que a película formada *in vivo* é caracterizada por uma rede semelhante a uma malha de partícula esférica, e os diâmetros destas partículas variam entre 10 e 20 nm, dentro de poucos minutos depois de formada a película, enquanto que em 30 minutos a 2 horas a camada de película é caracterizada por aglomerados de proteínas adsorvidas com diâmetro de 20-60 nm, e ainda podem ser detectados diâmetros maiores, de 100 nm.Tais alterações morfológicas são decorrentes de alterações na composição e conformação das proteínas adsorvidas na camada e podem ser tempo-dependentes, sendo consideradas como parte do processo de maturação (DEIMLING et al., 2004; HANNIG et al, 2001).

Uma película *in situ* formada em blocos de esmalte por 1 hora se mostrou mais espessa na face lingual dos dentes inferiores posteriores, pois nessa área os dentes eram constantemente banhados pela saliva das glândulas submandibulares e sublingual. Uma película mais fina era formada na superfície palatina dos dentes palatinos anteriores superiores (AMAECHI et al., 1999). Esses resultados demonstram que a estrutura final, morfologia e a espessura da película diferem com o tempo de formação, localização na cavidade bucal. Um trabalho recente revelou ainda que a composição proteica da PA é diferente em dentes decíduos e

permanentes (VUKOSAVLJEVIC; CUSTODIO; SIQUEIRA; ZIMMERMAN et al., 2013). A análise ultraestrutural da PA, empregando diferentes técnicas analíticas, auxilia no entendimento de sua interação com a superfície do esmalte e na compreensão da função da película, trazendo uma importante complementação às análises por espectrometria de massa.

2.5 Funções da PA

A PA provém da saliva, a qual confere uma cobertura orgânica às mucosas e dentes, formando uma película de proteína. Neste caso a saliva, está intimamente ligada à PA, auxiliando na neutralização dos ácidos, que poderiam desmineralizar a estrutura dentária, protegendo a superfície dentária contra o desgaste, participando na manutenção do equilíbrio hídrico, regulando a excreção de líquido do organismo. Possui ainda propriedades de lubrificação, reduz o atrito entre as superfícies e tecidos diminui o desgaste mecânico, além de auxiliar no processamento dos alimentos juntamente com a mastigação dos dentes e atuar na função digestiva, onde fornece o umedecimento dos alimentos, visando à formação do bolo alimentar (FABIAN et al., 2012).

A PA está envolvida com o processo de **lubrificação** das superfícies dos dentes, aumentando assim a eficiência da fala, bem como da mastigação. Forma uma cobertura que confere proteção aos tecidos bucais contra agentes irritantes. Estão envolvidas nesse processo as mucinas, onde sua principal função é proporcionar uma camada protetora sobre os tecidos duros e moles da boca e contra a erosão do esmalte. Estão envolvidos nesse processo também a PRP 1 e estaterina (BUZALAF; HANNAS; KATO, 2012; LAMKIN; OPPENHEIM, 1993; SIQUEIRA; CUSTODIO; MCDONALD, 2012; TABAK, 1990)

Vários estudos *in vitro* e *in situ* mostram claramente que a PA tem **efeito protetor contra a desmineralização** causada por agentes químicos ou de origem bacteriana (AMAECHI; HIGHAM, 2001; FINKE; PARKER; JANDT, 2002; HANNIG, C. et al., 2005; HANNIG, M. et al., 2004; HANNIG, M. et al., 2003)

A histatina fosforilada fornecem um maior nível de proteção contra o desafio ácido e a estaterina também contribui para a natureza ácido-protetora da PA. Além disso, as mucinas também contribuir para a resistência aos ácidos(CHEAIB; LUSSI,

2011). A PA se comporta como uma **barreira seletiva**, tendo um papel determinante contra a desmineralização por desafios ácidos de origem microbiana ou erosiva. A película tem a capacidade de modificar a difusão do ácido e promover a incorporação e transporte de íons de cálcio, fosfato e fluoreto durante a remineralização. No entanto, o mecanismo que regula a difusão dos íons entre a superfície do esmalte e o ambiente bucal na presença da PA ainda não é completamente compreendido (HANNIG, M.; JOINER, 2006; LEE, C.A.; ISMAIL; VICKERS)

A PA tem propriedade importante em conferir o **equilíbrio no meio bucal ao que diz respeito à saúde e doença**. Na cavidade bucal, embora os organismos possam ser derivados da água, de alimentos e outros fluidos nutricionais, a principal via de transmissão é a saliva. Os primeiro colonizadores aparecem dentro de minutos na superfície de um dente limpo (SAXTON, 1973), sendo constituídos principalmente por estreptococos (*S. salivarius*, *S. mitis* e *S. oralis*), os quais correspondem 80% dos colonizadores iniciais. (HANNIG, M.; JOINER, 2006).

A relação da PA com a colonização microbiana é determinada pelo reconhecimento dos receptores específicos, juntamente com a rugosidade e energia livre de superfície. Pode ocorrer também através de um mecanismo através do qual as bactérias específicas se ligam a proteínas adsorvidas. Por exemplo, histatinas e estaterinas inibem a adesão de *S. mutans*, mas a própria estaterina promove a adesão de várias espécies bacterianas, como *A. naeslundii* e *F. nucleatum* (SIQUEIRA; CUSTODIO; MCDONALD, 2012). A PA desempenha um papel importante nas propriedades físico-químicas, bem como na defesa imunitária nas superfícies mucosas bucais (FABIAN et al. 2012).

Um estudo *in vivo* identificou mais de 100 proteínas da PA. Destas, aproximadamente 8% têm atividade antimicrobiana incluindo cistatinas, lisoenzima, mieloperoxidase e histatinas. Em adição, 11% dessas proteínas estão envolvidas na resposta imune adquirida e inata, ambas necessárias na defesa do hospedeiro contra patologias. Estão envolvidas nessas funções proteínas como calgranulina A e calgranulina B, amilase salivar, PRPs, mucinas e estaterina, IgA e IgG (SIQUEIRA et al., 2007b). Essas proteínas exercem propriedades imunomoduladoras, de forma que a defesa imunológica atua promovendo aglutinação microbiana, lise da membrana de bactérias, além de ter funções antifúngicas e antivirais (FABIAN et al. 2012). Em outro estudo *in vitro*, foi relatado que a atividade antifúngica da histatina 5

afeta a aderência e crescimento da *C. albicans* em substratos de hidroxiapatita e PMMA (VUKOSAVLJEVIC et al.).

Sendo a PA constituída por um filme predominantemente proteico, é de grande importância a compreensão do papel deste filme orgânico, assim como a identificação, no mesmo, de possíveis biomarcadores para várias doenças, como cárie e doença periodontal. (HANNIG, M.; JOINER, 2006; SIQUEIRA; CUSTODIO; MCDONALD, 2012; SIQUEIRA et al., 2007b). A saliva e o fluido crevicular gengival contêm marcadores local e sistemicamente derivados da doença periodontal. Portanto, a coleta desses dois fluidos pode oferecer a base para uma avaliação do paciente com periodontite e outras doenças sistêmicas. Recentes avanços em diagnóstico da imunodeficiência humana (HIV) foram feitos usando fluidos bucais. O estudos têm demonstrado que esses testes baseados em anticorpos salivares específicos são equivalentes em confiabilidade quando se compara àqueles realizados no soro, sendo, portanto úteis na utilização clínica e em estudos epidemiológicos (AMADO et al., 2005; TABA et al., 2005). Sendo a saliva uma importante fonte das proteínas encontradas na PA, é de se esperar que, assim como a saliva, a película também contenha importantes biomarcadores. A coleta tanto de saliva quanto de película é um método não invasivo, daí o interesse no seu emprego para diagnóstico de doenças sistêmicas.

2.6 PA formada sobre esmalte e dentina em diferentes tempos e o seu papel protetor

O esmalte dentário é a estrutura que recobre a coroa dos dentes, sendo o tecido mais mineralizado do organismo e o único completamente acelular. Apresenta na sua composição uma alta quantidade (97%) de material inorgânico, sendo o restante constituído por aproximadamente 1% de material orgânico e 2% de água. A dentina tem como principal função fornecer suporte para o esmalte dentário. Para tal finalidade, a dentina se apresenta como um tecido duro e ao mesmo tempo com certa elasticidade. É um tecido biológico hidratado composto de 70% de material inorgânico, 18% de material orgânico e 12% de água.

A matriz orgânica do esmalte está representada por 60% de proteínas e 40% de lipídeos, além de traços de açúcares, citrato e íons lactato. A matriz orgânica da

dentina é representada por cerca de 90% de colágeno tipo I e os outros 10% compreendem proteínas não colagênicas. Para ambos os tipos de tecidos, esmalte e dentina, a matriz mineral é constituída por hidroxiapatita carbonatada, pois o carbono representa cerca de 3% na sua constituição. Na sua composição química ainda podem ser adicionados diferentes constituintes, como sódio, potássio, magnésio. A quantidade e a natureza desses substituintes estão relacionadas ao processo de mineralização, em decorrência da heterogeneidade do mesmo (NANCI, 2011).

Recentemente vários estudos têm se concentrado no impacto protetor da PA contra a erosão em esmalte dentário (HANNIG, C. et al., 2005; HANNIG, M.; BALZ, 1999, 2001; HANNIG, M. et al., 2004; HANNIG, M. et al., 2003; WETTON et al., 2006). Em virtude do decréscimo da prevalência de cárie a partir dos anos 1960, a preocupação com a perda dos dentes tem-se voltado para outras causas, como o desgaste dentário (ATTIN; ZIRKEL; HELLWIG, 1998), sendo a erosão dentária o tipo de lesão não cariosa que mais tem sido documentado (MOSS, 1998; SMITH; KNIGHT, 1984). A erosão pode ser definida como uma lesão crônica, localizada, caracterizada pela perda de tecido duro devido à exposição a ácidos de origem não bacteriana, o que a difere da cárie. Difere também de outras lesões não cariosas, tais como abrasão, que ocorre devido a forças mecânicas; atrição, a qual se deve ao contato dente a dente e abfração, que ocorre devido a forças que atuam na região cervical dos dentes (MISTRY; GRENBY, 1993; TEN CATE; IMFELD, 1996).

A erosão dentária pode ser classificada, levando-se em consideração sua etiologia, em extrínseca ou intrínseca (IMFELD, 1996; LUSSI, 1996; MAGALHAES et al., 2009). A erosão intrínseca é decorrente da atuação crônica do ácido gástrico sobre a superfície dentária, por um longo período e de forma regular (MEURMAN; TEN CATE, 1996; SCHEUTZEL, 1996). A erosão extrínseca seria o resultado do efeito de ácidos exógenos, provenientes, por exemplo, dos ácidos contidos na dieta, bem como nas formulações medicamentosas (LUSSI, 1996). A maioria dos alimentos e bebidas de baixo pH (abaixo de 4,5) apresenta potencial para causar a erosão dentária, pois neste pH existe uma subsaturação dos fluidos orais em relação à hidroxiapatita e em relação à fluorapatita(MAGALHAES et al., 2009; ZERO, 1996).

Películas formadas *in situ* por 0,5, 1 e 2 horas (HANNIG, M. et al., 2004) ou por 2, 6, 12 e 24 horas (HANNIG, M. et al., 2003), respectivamente, não diferem significativamente na sua habilidade em reduzir a desmineralização do esmalte.

Entretanto, a resistência ácida da película parece ser dependente do seu tempo de formação, uma vez que a película de 2 horas se dissolve da superfície do esmalte mais rapidamente comparada a películas formadas por 6, 12 e 24 horas. Para entender o papel protetor da PA contra um desafio ácido é importante não apenas medir a perda do esmalte, mas também avaliar o efeito do desafio ácido sobre a morfologia e a espessura da camada de película. (HANNIG, M. et al., 2003).

Um estudo avaliou o papel protetor na PA formada *in vitro* (24 horas) em esmalte exposto a ácido cítrico 0,1% ou 1,0% por 1, 5 ou 10 minutos. Redução significativa da dureza foi observada nos espécimes após 1 minuto de exposição ao ácido cítrico 0,1%. A perda de dureza foi tempo- e concentração-dependente. A película significativamente inibiu a perda de dureza, exceto para 10 minutos de imersão em ácido cítrico 1% (STROICI et al, 2012). Alguns estudos *in vitro* relatam que o potencial protetor da película é reforçado com o aumento do temp de formação, pois o processo de maturação com duração de vários dias é necessário para que a película obtenha a sua propriedade funcional total (HANNIG, M.; JOINER, 2006; ZAHRADNIK; MORENO; BURKE, 1976).

Outro estudo verificou o efeito das proteínas da PA, tais como, mucina e caseína, contra a erosão no esmalte. As amostras foram imersas em saliva humana por 2 horas e receberam diferentes tratamentos com água deionizada, mucina, caseína, ou uma combinação de mucina e caseína por 2 horas. Em seguida, as amostras foram expostas a ácido cítrico 0,65% (pH 3,5) por 1 minuto. Os resultados demonstram claramente que o efeito protetor da película foi modificado pela caseína (0,5%) e mucina (0,27%). O tratamento combinado com caseína e mucina resultou numa redução significativa do amolecimento do esmalte após o tratamento. Os resultados sugerem que interações proteína-proteína podem ter um importante papel na efetividade da PA em proteger contra a erosão (CHEAIB; LUSSI, 2011).

A informação acerca do papel da PA para a dentina é bastante limitada. Devido às diferenças na composição entre o esmalte e a dentina, pode-se hipotetizar que a composição da PA formada sobre estes dois tipos de tecidos dentários, bem como seu papel protetor contra a erosão são distintos. Num estudo *in situ* conduzido por 14 dias, foi demonstrado que a saliva ofereceu melhor proteção contra erosão para o esmalte do que para a dentina. Foi observada uma perda significativamente menor de esmalte que de dentina para amostras armazenadas *in situ,* comparadas àquelas armazenadas em água ou saliva *in vitro* (HALL et al.,

1999). Em outro estudo *in* situ, a PA foi formada durante 2 horas sobre blocos de dentina, sendo que em seguida esses blocos foram incubados com solução de ácido clorídrico (HCl), pH 2,3, por 5 minutos. Os resultados demonstraram que a espessura da dentina desmineralizada após o contato com o ácido não foi diferente para espécimes recobertos ou não pela película, mas a presença da película reduziu significativamente a perda de cálcio das amostras de dentina (HANNIG, C. et al., 2007).

Em contraste, no trabalho de Hara e colaboradores foi observado que uma película formada *in situ* durante 2 horas não foi efetiva em reduzir o amolecimento da dentina induzido por um desafio ácido (suco de laranja), por diferentes tempos de 10, 20 e 30 minutos. Entretanto, a falta de efeito protetor encontrada neste caso pode ter sido devida ao grande desafio erosivo empregado (HARA et al., 2006).

Foi analisada a capacidade protetora da PA formada *in situ* contra a erosão no esmalte e da dentina causada pelos ácidos hidroclórico, cítrico e fosfórico (WIEGAND et al., 2008). Foi formada a PA durante 2 horas, sobre espécimes de esmalte e dentina bovinos. Na sequência, os espécimes foram imersos extraoralmente em 1 mL de ácido hidroclórico, 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 (±DP) conferida pela película (porcentagem de redução de perda de cálcio) foi significativamente melhor para o esmalte (60,9±5,3) que para a dentina 30,5±5,0), mas não houve diferença entre os tipos de ácidos.

Em outro estudo foram observados achados semelhantes, ou seja, redução na perda de cálcio entre 60 e 78% para amostras de esmalte erodidas por ácidos cítrico 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 clorídrico (pH 2,3, 5 minutos).

Um estudo *in vitro* foi proposto para determinar o efeito protetor da PA formada sobre esmalte e dentina durante períodos de tempo até 4 horas. Os blocos

foram imersos em saliva não estimulada por 2 minutos, 30 minutos, 1, 2 e 4 horas. Em seguida, as amostras foram expostas a ácido cítrico 0,3%, pH 3,2, durante 10 minutos. Este ciclo foi repetido 12 vezes. Para o esmalte, encontrou-se proteção estaticamente significativa quando foi feita formação da película por tempo igual ou superior a 1 hora. Já para a dentina, proteção foi alcançada com 2 minutos de formação da película. Os resultados demonstraram que a saliva protege mais do que a água, sendo esta proteção proporcionalmente maior para o esmalte (44%) do que para a dentina (14%). Essa relação dos diferentes graus de proteção do esmalte e da dentina pode ser explicada pela hipótese de que a saliva penetra no sistema tubular da dentina, produzindo não uma camada de película na superfície, mas um menisco de líquido viscoso nos orifícios do túbulo (WETTON et al., 2006).

Pode-se hipotetizar que diferenças na estrutura do esmalte e da dentina podem afetar a composição da PA e, desta maneira, o seu potencial protetor, que é atribuído à sua habilidade em agir como uma barreira de difusão ou uma membrana semi-permeável (GLANTZ; BAIER; CHRISTERSSON, 1996; HANNIG, M. et al., 2003; HARA et al., 2006). Em virtude do exposto, fica claro que mais estudos são necessários para se analisarem possíveis diferenças na composição e estrutura da PA formada sobre o esmalte ou sobre a dentina, que possam explicar os diferentes graus de proteção da película nestes dois tipos de substratos dentários. Uma vez conhecidas estas diferenças, poder-se-á investigar os possíveis componentes da película que estejam mais diretamente associados ao seu potencial protetor contra a erosão. Assim, será possível delinear protocolos preventivos visando ao enriquecimento da película com estas proteínas protetoras em etapas futuras.

2.7 Recentes abordagens proteômicas

A abordagem proteômica tem sido utilizada há muitos anos para monitorar alterações na expressão de proteínas. Inicialmente, as análises de proteínas eram realizadas por eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida. No entanto, o desenvolvimento de novos métodos de espectrometria de massa (MS) fez com que a identificação de proteínas fosse mais favorável, contribuindo para expandir a gama de aplicações proteômicas. A caracterização da estrutura primária de proteínas por MS foi avançada por métodos como ionização por *spray* de elétrons (ESI) e

dessorção a laser assistida por matriz (MALDI). O acoplamento de MALDI e ESI com analisadores de massa, como os quadrupolares / ion trap linear, time-of-flight (TOF), quadrupolar TOF (QTOF), ressonância ciclotrônica de íons transformada de Fourier (FT-ICR), e o Orbitrap, aumentam a sensibilidade, resolução, precisão e velocidade para a sequência de elucidação proteína. A sensibilidade de MS e MS / MS permite a identificação de proteínas em níveis inferiores a 1 picomole (pmol, 10^{-12} mol) e, em muitos casos em níveis de femtomoles (fmol, 10^{-15} mol).

No início da década de 1980, a espectrometria de massas começou a ser aplicada e tornou-se uma ferramenta revolucionária na química de proteínas. A espectrometria de massas (MS/MS) é uma técnica analítica que caracteriza as moléculas pela medida da relação massa/carga de seus íons. Inicialmente, ela foi aplicada na determinação de massas atômicas, e atualmente vem sendo utilizada na busca de informações sobre a estrutura de compostos orgânicos, na análise de misturas orgânicas complexas, na análise elementar e na determinação da composição isotópica dos elementos.

O método mais clássico de identificação de proteínas por MS é denominado PMF (impressão digital das massas de peptídeos). Esta metodologia é baseada na digestão da proteína a ser identificada por uma enzima proteolítica (por exemplo, a tripsina), produzindo peptídeos. As massas desses peptídeos são submetidas a *softwares* especiais, que permitem comparar a PMF da proteína que queremos identificar com os dados gerados teoricamente para todas as sequências de proteínas presentes nos bancos de dados (WOLSKI et al, 2005).

O termo proteômica foi inicialmente utilizado em 1995, sendo definido como um novo campo de estudo e tecnologia que se propõe a analisar de forma global o conjunto de proteínas, expressas numa célula ou tecido, a partir do genoma. Os estudos de análise proteômica vêm complementar os dados e análises e sequenciamento de genomas, auxiliando na compreensão das redes de funcionamento e regulação celular, representando a ponte de ligação entre genótipo e fenótipo do organimos. (SALVATO; CARVALHO; LIMA LEITE, 2012)

Recentemente, vários trabalhos utilizando análise proteômica foram introduzidos como uma nova abordagem para a identificação da composição da película (YAO et al, 2000; VITORIO et al, 2003; VITORIO et al, 2007; SIQUEIRA et al, 2007; SIQUEIRA et al, 2009; SIQUEIRA et al, 2010; SIQUEIRA et al, 2012; SIQUEIRA et al, 2013). Há uma inter-relação entre as funcionalidades das proteínas

e os processos de dinâmica, estrutura tridimensional e interação intermolecular. Esses aspectos ditam os mecanismos e propriedades que essas proteínas têm na cavidade bucal. Isso proporciona um impulso para o desenvolvimento de tecnologias analíticas confiáveis, sensíveis e de alta resolução indispensáveis para monitoramento do enovelamento de proteínas, estrutura e dinâmica com métodos computacionais associados para detalhado interrogatório de biomoléculas com estrutura primária e secundária.

3 PROPOSIÇÃO

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo principal deste trabalho foi comparar a composição proteica diferencial em películas adquiridas formadas *in situ*, em diferentes tempos (10 minutos e 2 horas), sobre diferentes substratos (esmalte e dentina), utilizando abordagem proteômica livre de marcadores (nLC- ESI-MS/MS).

As seguintes hipóteses nulas foram testadas:

1. Não há diferenças na composição proteica em películas adquiridas formadas sobre esmalte e dentina;
2. O tempo de formação da película não altera o seu perfil de composição proteica, tanto para o esmalte quanto para a dentina.

4 Material e Métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Seleção dos voluntários

Este trabalho foi encaminhado ao Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da FOB-USP, obtendo sua aprovação do ponto de vista ético, sob nº 038/2011 (Anexo A). Os voluntários só participaram da pesquisa, após uma explicação minuciosa de seus objetivos a partir da leitura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, o qual foi, em seguida, assinado (Anexo B).

Foram selecionados 9 voluntários, com idade de 18 a 35 anos, do gênero feminino, não fumantes, em bom estado de saúde geral e bucal (sem gengivite, periodontite e nenhuma outra condição bucal que pudesse afetar a composição dos fluidos bucais, como alcoolismo, presença de cálculo dentário). Os voluntários não estavam fazendo uso de medicamentos.

A saliva de cada voluntário foi coletada conforme os padrões estabelecidos para avaliação de fluxo salivar e pH normal. A coleta foi realizada no período da manhã, após o desjejum, em ambiente individual, climatizado e iluminado. O fluxo salivar não estimulado e estimulado dos voluntários foi aferido antes do início do experimento.

Para o fluxo salivar não estimulado, cada voluntário se acomodou em uma cadeira, e cuspiu por 10 minutos em recipientes de plástico calibrados, os quais foram pesados antes e depois da coleta de saliva. Considerando a densidade da saliva aproximadamente igual a 1, foram determinados o volume e a velocidade de saliva liberada (mL/min) devendo ser superior a 0,1 (mL/min). O pH da saliva foi mensurado a partir de um pHmetro. O mesmo procedimento foi realizado para a saliva estimulada, exceto que nesta ocasião cada voluntário mastigou um pedaço de parafina durante 1 minuto, e em seguida cuspiu por 5 minutos em recipientes plásticos calibrados, os quais foram pesados antes e depois da coleta de saliva. O fluxo foi considerado normal quando foi superior a 1 mL/min (WONG, 2009). Portanto, para o fluxo salivar estimulado, obteve-se uma média de 1,6 mL/minuto e pH 7,9, estando os voluntários aptos para participarem da pesquisa. Para o fluxo salivar não estimulado, obteve-se uma média de 0,5 mL/minuto e pH 6,7.

4.2 Delineamento experimental

Na etapa *in situ,* a coleta da PA foi realizada a partir de dentes pré-molares humanos (esmalte ou dentina), os quais foram cortados para a obtenção de blocos 3 mm X 3mm, cuja base foi desgastada. Em seguida os blocos de esmalte e dentina foram protegidos com esmalte de unha (Risque, Niasi, Taboão da Serra-SP) e inseridos na moldeira de silicone com a cera de utilidade (Wilson, Polidental, Cotia - SP) para a coleta de PA, conforme demonstrado na Figura 2.

Figura 2 – Esquema demonstrando a confecção do dispositivo.

4.3 Preparação dos espécimes

4.3.1 Seleção e corte dos dentes humanos

Para o presente estudo, foram utilizados dentes pré-molares humanos, obtidos a partir do Banco de Dentes da FOB/USP (Anexo C), livres de cárie, os quais foram mantidos com solução tamponada de timol 2% a 4º C, em pH 7,0, e submetidos à análise visual, para a averiguação de possíveis manchas e trincas, situação na qual foram excluídos da amostra.

4.3.2 Obtenção dos blocos de esmalte e dentina

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.), para preparar os dentes para o corte.

Inicialmente 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). Em seguida, as coroas dos dentes foram fixados com godiva termoativada (Kerr Corporation, EUA) em uma placa de acrílico (40 X 40 X 5 mm), para facilitar a adaptação posterior na máquina de corte. Em seguida, a placa foi parafusada em um aparelho de corte de corte de precisão ISOMET Low Speed Saw (Buehler Ltd, EUA) e com dois discos diamantados de dupla face - XL 12205, “High concentration”, 102 x 0,3 x 12,7 mm (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 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, deu-se prosseguimento ao 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 vestíbulo-lingual. Na sequência, o cemento foi removido através de desgaste, sendo este procedimento checado ao microscópio.

Os blocos selecionados para o projeto não continham manchas, trincas e rachaduras, permanecendo ao final, os 54 blocos de esmalte e 54 blocos de dentina.

4.3.3 Planificação dos blocos de esmalte e dentina humana

Os blocos de esmalte e dentina foram fixados com cera para escultura para prótese fixa (Kota Ind. e Com, Ltda., São Paulo, SP) com auxílio de um instrumento PKT (Duflex Ind. Bras.) e uma lamparina (JON, Ind. Bras.) no centro de um disco acrílico cristal (30 mm de diâmetro por 8 mm de espessura) (Figura 3). Os espécimes ficavam com a sua superfície que seria exposta ao meio bucal voltada para o disco. Primeiramente, a planificação da base dos espécimes foi realizada de forma manual, utilizando uma lixa de polimento com granulação 320 (Extec Corp.), com o intuito de apenas retirar o excesso. Em seguida, o conjunto (disco/espécime) foi adaptado em uma politriz metalográfica (APL 4, Arotec, Cotia, SP) com sistema de polimento múltiplo capaz de realizar o polimento automático de 6 corpos de prova, facilitando o paralelismo entre as superfícies dos blocos e a base de acrílico.

Para a planificação, foi utilizada uma lixa de polimento com granulação 600 (Extec Corp.), com refrigeração de água deionizada, até que a espessura se aproximasse a 3 mm. A politriz foi acionada em baixa velocidade, com os pesos padrões de 86 g, com tempo de 1 a 3 minutos até que alcançasse a espessura desejada. Para os blocos de dentina, o tempo de desgaste foi menor, devido à menor espessura. Neste caso, foi feita planificação manual apenas, como lixa de polimento de granulação 320 apenas. No final, o conjunto espécime/disco foi levado a um aparelho de ultra-som T7 Thornton (Unique Ind. e Com. de Produtos Eletrônicos Ltda., São Paulo, SP), com frequência de 40 KHz, durante 5 minutos, com água destilada deionizada. Após o preparo, os blocos tiveram toas as suas superfícies, com exceção da que seria exposta ao meio bucal, protegidas com esmalte de unhas.

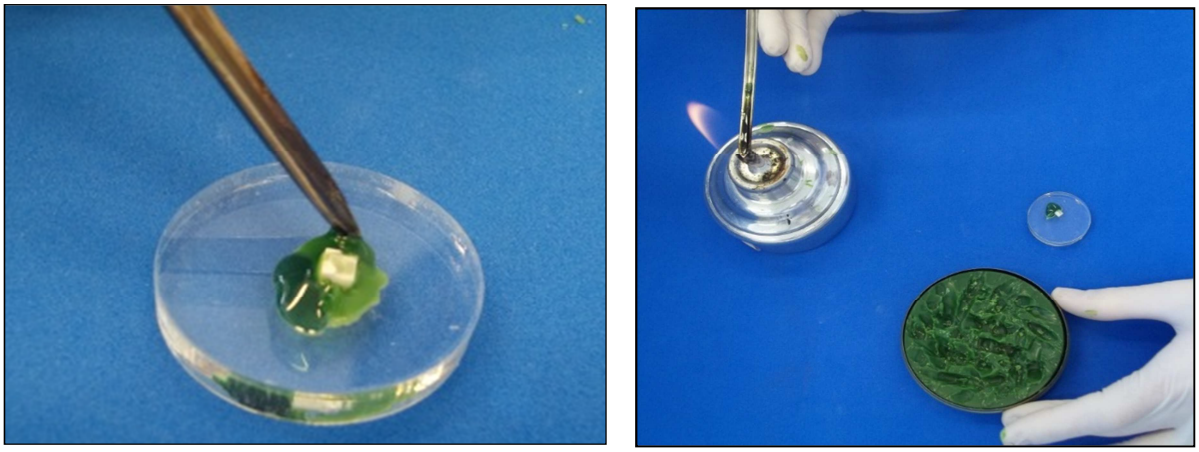


Figura 3 – Espécimes sendo fixados na placa acrílica para planificação da base.

4.3.4 Preparação do dispositivo vestibular

Os voluntários selecionados tiveram seus arcos inferiores moldados com alginato (Ava Gel, Dentsply, São Paulo- SP) para a confecção do modelo em gesso pedra. Sobre este modelo foi confeccionada uma moldeira de silicone (moldeira de clareamento dentário, no laboratório de prótese da Faculdade de Odontologia de Bauru, empregando-se uma plastificadora a vácuo (Bio Art, São Carlos - SP) (Figura 4). Os espécimes foram inseridos no dispositivo, com o auxílio de lâminas de cera, 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).

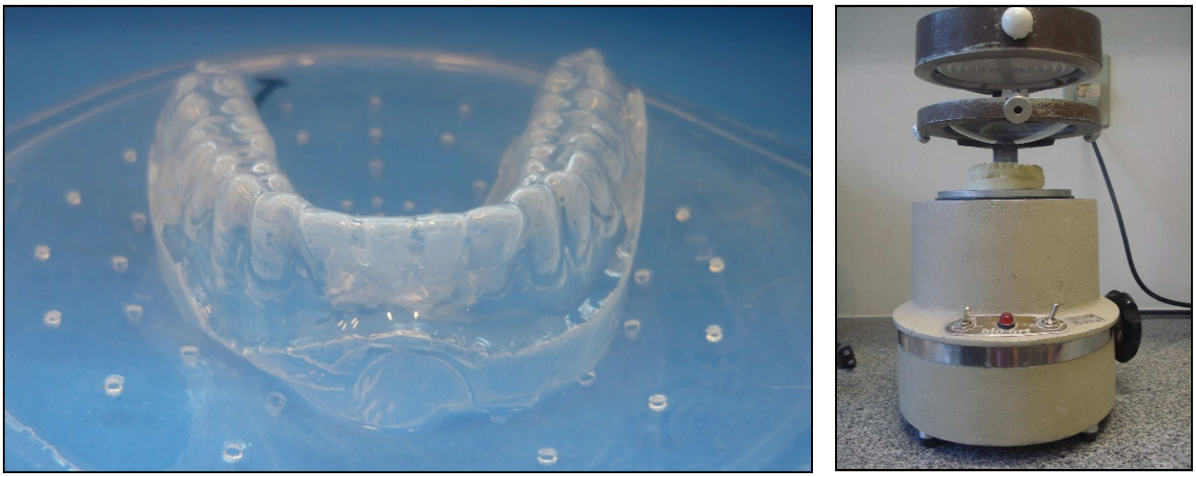


Figura 4 - Confecção do dispositivo vestibular

4.4 Protocolo *in situ* para formação e coleta da PA

A formação da película foi realizada *in situ*, sobre blocos de esmalte e dentina humanos, fixados em dispositivos mandibulares vestibulares (moldeiras de clareamento dentário). Em cada dispositivo, em cada dia de experimento, foram fixados, na face vestibular, 6 blocos de esmalte e outros 6 de dentina.

O experimento foi realizado em três dias subsequentes, tendo início no período da manhã (08:00), para evitar os efeitos circadianos na composição da película. Primeiramente os voluntários receberam uma meticulosa profilaxia dentária com jato de bicarbonato, para que a PA fosse completamente removida da superfície dos seus dentes. Simultaneamente, seis blocos de esmalte e dentina foram separados para cada voluntário (n= 9), para os três dias de coleta. Cada bloco foi submetido também a uma profilaxia, antes da coleta da película em cada um dos três dias, utilizando a pasta profilática sabor tutti-fruti (Herjos, Vigodent, RJ), e uma escova de Robinson (escova de Robinson para contra-ângulo, Microdont, Socorro, SP), Figura 5. Em seguida, os blocos foram fixados nas moldeiras de silicone com cera utilidade (Wilson, Polidental, Cotia - SP), sendo os blocos de esmalte e dentina alternados, para depois serem inseridos na cavidade bucal para formação da PA.

Figura 5 – Profilaxia e fixação dos blocos de esmalte e dentina no dispositivo vestibular.

O procedimento para a coleta da PA foi idêntico nos 3 dias. Foi coletada a película formada nos tempos de 10 e 120 minutos, sendo a mesma coletada de 3 blocos de esmalte e 3 de dentina, em cada tempo. A distribuição dos blocos nas moldeiras, e a coleta da PA nos mesmos, foram realizadas de forma aleatória. Esses tempos foram selecionados para que se pudesse comparar a composição proteica da película jovem e madura. O tempo máximo de 120 minutos foi escolhido para se evitar a possível agregação bacteriana, que poderia interferir nos resultados. Durante este período, os voluntários foram privados do consumo de alimentos e bebidas.

Após os períodos experimentais (10 minutos e 120 minutos), os dispositivos foram removidos da boca e lavados cuidadosamente com água. Em cada tempo, foram retirados 3 blocos de cada substrato para a coleta da PA, que foi feita com auxílio de um papel filtro de eletrodos (electrode *wick filter* paper, de 5 X 10 mm, Bio-Rad, Hercules, CA, EUA), cortado ao meio, para diminuir o seu tamanho e aumentar a área de contato, pré mergulhado em ácido cítrico 3% contendo coquetel inibidor de proteases (Complete, 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 e friccionado (esfregado sem pressão) sobre a superfície dos blocos de esmalte e dentina (SIQUEIRA et al., 2007b). O mesmo papel filtro foi utilizado para coletar a PA dos 3 blocos de esmalte e um outro dos 3 blocos de dentina obtidos de cada voluntário, em cada tempo.

No final de cada dia, os mesmos blocos de esmalte e dentina, de cada voluntário foram armazenados em recipientes de plásticos, contendo saliva artificial (KLIMEK; HELLWIG; AHRENS, 1982) por 24 horas. Por fim, cada amostra de PA foi armazenada em criotubos individuais para facilitar o manuseio e evitar possíveis degradações proteicas. Para a análise proteômica, foi feito um *pool* com os papeis coletados nos 3 dias, de cada voluntário, para cada tempo (10 ou 120 minutos) e

tipo de substrato (esmalte ou dentina). Portanto, para cada uma das condições acima descritas, o *pool* continha 27 papeis (3 dias de coleta X 9 voluntários). Após a coleta, os papeis foram armazenados a -80℃ até ser em transportadas dentro de criotubos, em temperatura ambiente, para a *Schulich School of Medicine & Dentistry, University of Western Ontario, Canadá*. Ao chegarem no laboratório (Siqueira Lab.), as amostras foram mantidas a -80ºC até a análise.

4.5 Preparação das amostras

Os experimentos de análise proteômica da PA foram realizados sob a supervisão do Prof. Dr. Walter L. Siqueira, no Laboratório de Bioquímica, Schulich School of Medicine & Dentistry, University of Western Ontario (Canadá), dentro do programa BEPE (FAPESP).

4.5.1 Eluição das proteínas da PA por sonicação

Primeiramente foi necessário fazer a extração das proteínas coletadas nos papeis filtro. Como mencionado acima, as amostras foram separadas em 4 grupos, de acordo com o substrato e tempo de formação da PA, sendo feito um *pool* com os 9 papéis coletados por dia de cada grupo em um microtubo, totalizando 27 papéis por grupo. Os papeis foram picotados, utilizando uma tesoura previamente desinfetada em álcool 70% (Figura 6).

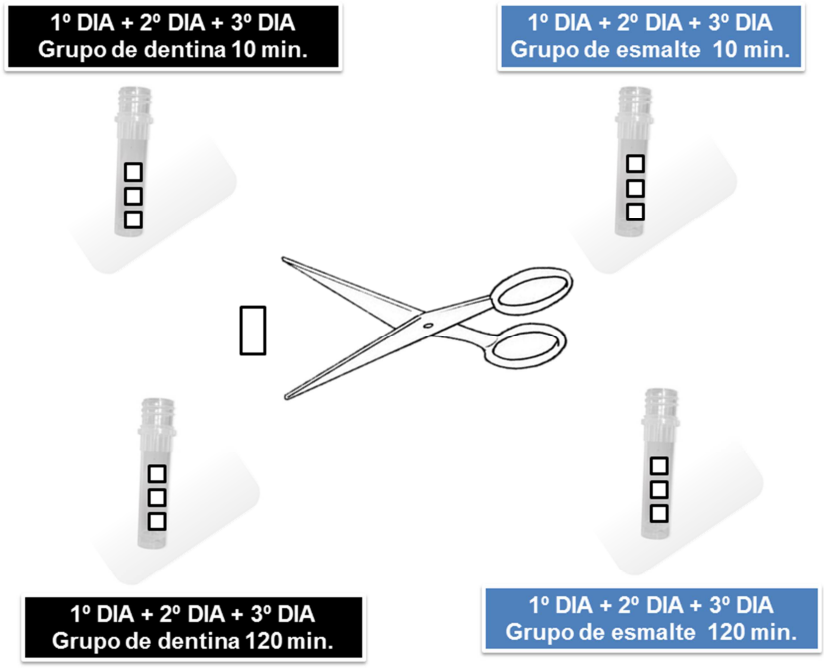


Figura 6 – Agrupamento das amostras de PA.

Em seguida, para a extração das proteínas a partir dos papéis, foram adicionados 200 µL de 50 mM de bicarbonato de amônio (NH_4HCO_3, pH 7,8) em cada microtubo (contendo o *pool* dos 27 papeis). Na sequência, foi feita sonicação durante 5 minutos em gelo. Este procedimento foi repetidos por mais 3 vezes, sendo que cada vez a solução era recuperada e colocada em um novo microtubo. Após as 4 sonicações, as amostras foram centrifugada por 20 minutos a 14000 G, coletou-se o sobrenadante, e obteve-se um volume final de 800 µL. O procedimento de centrifugação foi realizado para eliminar as fibras dos papéis filtros. Em sequida, este volume final foi reduzido em *SpeedVac* (Eppendorf, Parkway, NY, EUA) até atingir um volume de 300 µL para cada amostra.

4.5.2 Digestão em solução

Em seguida, foi adicionado 50 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. Em sequência, foi adicionado 150 µL de solução 2 (50 mM NH_4HCO_3, pH 7,8) sendo que o pH de cada amostra foi verificada, e quando necessário o pH das amostras foi ajustado para 7,8 com TFA 50% (ácido trifluoroacético) ou NaOH 1 M.

Foi necessário ajustar o pH para 7,8, para que a digestão tríptica tivesse seu efeito máximo. Em amostras piloto, foi estimada a quantidade de proteínas em cada grupo, através da técnica do ácido bicinconínico (mBCA - Thermo Fisher Pierce, Rockford, IL, EUA). Em seguida iniciou-se a digestão tríptica, nas amostras após a adição de tripsina 2% (w/w) (Promega, Madison, WI, USA), onde estas permaneceram incubadas por 16 horas a 37℃.

Após a incubação das amostras, as mesmas foram centrifugadas por 20 minutos a 14000 G, para que fosse possível extrair o líquido sem que tivesse interferência das fibras dos papéis filtro. O sobrenadante foi colocado em 2 microtubos diferentes (um contendo 100 µL, destinado à quantificação proteica e o outro contendo 200 µL, destinado à análise proteômica). As amostras foram secas no *SpeedVac* (Eppendorf, Parkway, NY, EUA).

4.5.3 Preparação para a quantificação de proteínas da PA

A alíquota de 100 µL de amostra foi utilizada na quantificação de proteína previamente à espectrometria de massas, pelo método mBCA (Protein Assay Reagent Kit, Micro BCA, PIERCE). O método mBCA é um kit comercial de dosagem de proteínas por amostra, que permite a detecção colorimétrica e a quantificação de proteína. O método combina a redução de Cu^{+2} a Cu^{+} por proteínas em meio alcalino (reacção 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 (o kit Micro BCA foi optimizado para utilização com amostras de proteína diluídas de 0,5 - 20 µg / mL). Para que fosse feito a quantificação, cada amostra foi ressuspensa em 300 µL de água deionizada, e a quantificação foi realizada em duplicata, seguindo as instruções do fabricante. Esta quantificação pós-digestão foi realizada com a finalidade de determinar a quantidade de amostra necessária para a análise em espectrometria de massas.

Após secas no *SpeedVac* (Eppendorf, Parkway, NY, EUA), as amostras foram submetidas ao procedimento conhecido por *ZipTip*®, com o objetivo de possibilitar a

concentração e purificação de peptídeos e proteínas de forma reprodutível e com alta recuperação, para melhoria da qualidade de dados.

As amostras foram ressupensas em 20 µL de solução de equilíbrio/lavagem (ácido trifluoroacético 0,1%) e foi então iniciado o procedimento conhecido como ZipTip®. Inicialmente, as ponteiras 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 trifluoacético 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*)*.

Em seguida, para a realização da quantificação, as amostras foram então ressuspensas em 300 µL de água e submetidas a *agitação (vórtex).* Foram adicionadas nas placas para cultura celular (Biosystems), 150 µL de padrão para µBCA e 150 µL de WR (reagente de trabalho), em duplicata. Em outros poços, foram adicionados 150 µL de amostras de esmalte ou dentina (10 minutos ou 120 minutos) + 150 µL de WR, também em duplicata. A placa foi coberta com parafilme e tampa e colocada a 37ºC, por 2 horas. Depois, a placa foi mantida em temperatura ambiente por 5 minutos. A absorbância foi medida a 562 nm.

Foi construída uma curva padrão, na qual a absorbância dos padrões foi plotada contra a sua concentração proteica (µg/mL), corrigindo-se pelos valores do Blank (Figura 7).

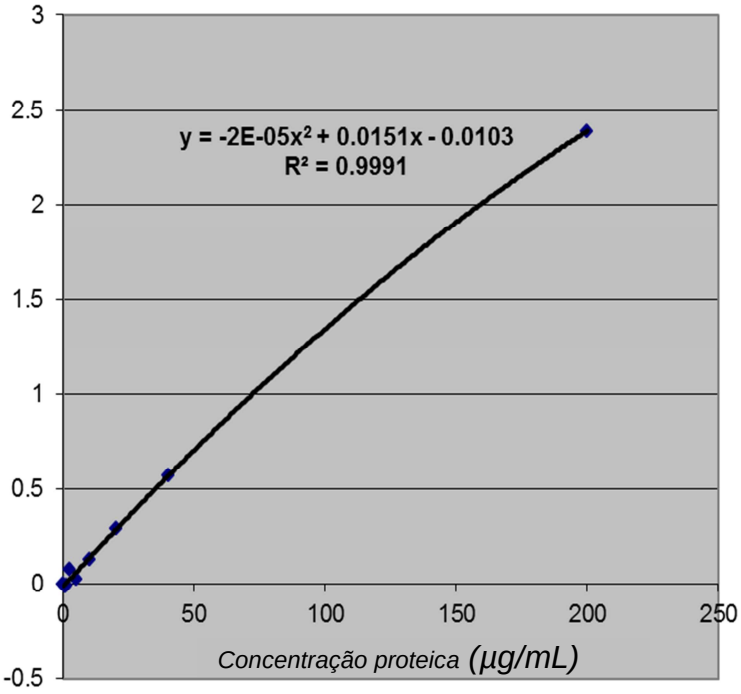


Figura 7 - Curva padrão do µBCA.

Após as análises pelo método mBCA, a concentração média de proteínas encontrada em cada *pool* foi 9,9, 9,3, 9,0 e 9,6 µg/mL para esmalte 10 minutos, esmalte 120 minutos, dentina 10 minutos e dentina 120 minutos, respectivamente.

Em seguida, as amostras destinadas à espectrometria de massas (200 µL) foram ressuspensas em 100 µL de tampão de equilíbrio (*equilibration/washing solution* - TFA 0,1%), agitadas em vórtex e submetidas ao procedimento de *Zip Tip*®, como descrito acima. Ao final desse processo, as amostras foram concentradas por *SpeedVac* (Eppendorf, Parkway, NY, USA), que foram armazenadas a 4ºC até a análise por espectrometria de massas (LTQ Velos, Thermo Scientific, Sao Jose, CA, EUA).

4.6 Análise em nLC-ESI-MS/MS

As análises de espectrometria de massas foram realizadas com o nano-HPLC Proxeon (Thermo Scientific, San Jose, CA, EUA), que permite as análises em cromatografia líquida *in-line* em coluna capilar de sílica fundida. Cada coluna era de 75 mm x 610 cm (Pico TipTM EMITTER, New Objective, Woburn, MA, EUA),

utilizando resina C-18 com poros de 5 µm e 200 Å (Michrom BioResources, Auburn, CA, EUA), ligado ao espectrômetro de massa com ionização por electrospray (LTQ- Velos, Thermo Scientific, Sao Jose, CA, EUA), modo de pesquisa de varredura na faixa de valores m / z 390-2000 em tandem MS / MS.

As amostras secas foram ressuspensas em 20 µL de ácido fórmico 1% e, em seguida, submetidas ao nLC-ESI-MS/MS. O HPLC de fase reversa *nanoflow* foi desenvolvido com gradiente linear de 85 minutos variando de 0% a 100% de solvente B (ácido fórmico 0,1% em acetonitrila) a uma taxa de fluxo de 200 nL/min com uma pressão máxima de 280 bar. A tensão de e*lectrospray* e a temperatura da transferência de íons foram de 1,8 kV capilar e 250℃, respectivamente. Cada espectro pesquisado (MS) foi seguido por seleção sequencial automatizada de sete peptídeos para CID, com exclusão dinâmica dos íons previamente selecionados.

4.6.1 Identificação e caracterização de proteínas

Os dados obtidos das análises MS/MS foram comparados utilizando os bancos de dados de proteínas humanas (UniProt TrEMBL, Swiss Institute of Bioinformatics, Genebra, Suíça, http://ca.expasy.org/sprot), utilizando o algoritmo SEQUEST no software Proteome Discoverer 1.3 (Thermo Scientific, San Jose, CA, EUA). Os filtros utilizados no SEQUEST como critério aplicado aos espectros MS/MS foram 1,5, 2,5, 3,1, 3,1 e 4,5 para o Xcorr aplicado em adição ao filtro *precolator*. Os resultados das buscas foram filtrados por uma taxa de falsa 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.

As proteínas identificadas foram classificadas e especificadas de acordo com a origem, função biológica e função na PA de acordo com RISON et al. (2000), Zimmerman et al. (2013) e Uniprot (*www.uniprot.org.com*).

4.7 Integração e quantificação proteômica

Para análise proteômica quantitativa, três arquivos a partir dos dados MS de cada grupo foram analisados usando o *software* SIEVE (Versão 2.0 *Thermo Scientific*, San Jose, CA, EUA). O processamento dos sinais foi realizado num total de 12 arquivos MS brutos. O fluxo de trabalho experimental do SIEVE foi definido como controle de comparação para as análises, onde uma classe de amostras é comparada com um ou mais diferentes classes de amostras. Neste estudo, as amostras de PA formada sobre dentina em 10 minutos foram comparadas com as amostras de PA formada sobre esmalte, em 10 minutos. Da mesma maneira, as amostras de PA formada sobre dentina em 2 horas foram comparadas com aquelas formadas sobre o esmalte, no mesmo período. Para a etapa de alinhamento, um único arquivo MS pertencente ao grupo esmalte, no respectivo tempo, foi selecionado como o arquivo de referência e os outros processos foram ajustados para gerar a melhor correlação com este. Após o alinhamento, os processos de detecção e integração (ou *framing*) foram realizados utilizando o nível de dados MS com um recurso denominado "quadros de MS2 Scans". Com este tipo de enquadramento *(framing)*, somente os valores MS com razão massa-carga (m/z) associados às análises MS2 são utilizados. Quaisquer medições de m/z que não estivessem presentes em MS2 foram ignoradas. O *software* gerou então os quadros (*frames)*, e a partir da integração foram feitas as análises estatísticas para cada quadro (*frame*). Em seguida as sequências de peptídeos obtidas a partir da pesquisa de banco de dados usando o Algoritmo SEQUEST no *Proteome Discoverer* 1.3 foram importadas para o SIEVE. O filtro *Percolator* foi aplicado às sequências peptídicas durante a importação, eliminando todas as sequências com *q-value* maiores que 1% (taxa de falsa detecção). Os peptídeos foram agrupados em proteínas e então foi calculada a razão e o valor de p. Foi utilizada uma média ponderada das intensidades de peptídeos para o cálculo das proteínas. Desta forma, os peptídeos com menor variação em suas medições de intensidade têm maior peso na taxa global de proteínas. Isto é feito para diminuir a variância das quantidades de proteína com base no nível de variação dos peptídeos que compõem cada proteína. Somente proteínas observadas nos dois grupos foram quantificadas. A abundância relativa de uma proteína individual a partir do nível do grupo esmalte foi considerada significativamente diferente quando os valores observados foram menores que 0,75

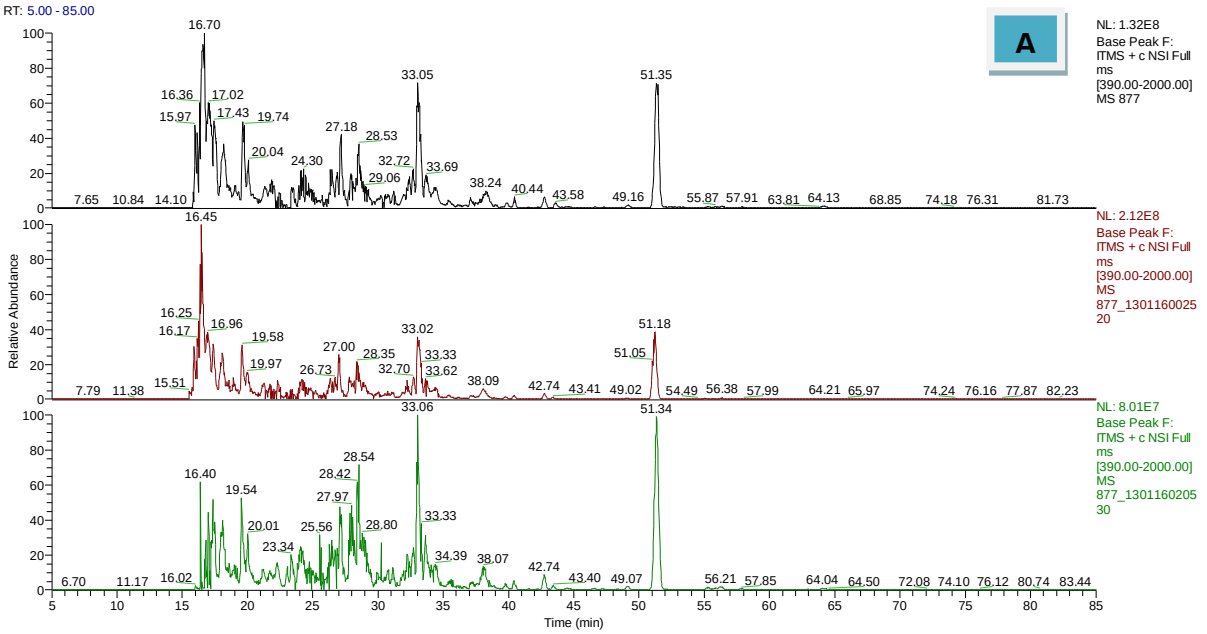
para diminuição e maiores que 1,25 para aumento de abundância. Além disso, foi considerado o valor de $p<0,05$.

5 Resultados e Discussão

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente estudo, o objetivo principal foi comparar o perfil proteômico da PA formada sobre o esmalte e sobre a dentina *in situ*. Considerando-se que é esperado que a composição da película fosse diferente de acordo com o tempo de sua formação (LEE, Y.H. et al., 2013; SIQUEIRA; CUSTODIO; MCDONALD, 2012) a mesma foi coletada em 2 diferentes tempos de formação: 10 e 120 minutos, correspondendo a uma película jovem e madura, respectivamente.

Os cromatogramas base-pico para cromatografia de fase inversa monitorada pelo espectrômetro de massa, representando a intensidade de todos os íons de peptídeos da amostra em uma única corrida. Para cada grupo, foram realizadas pelos menos 3 corridas, de 85 minutos cada. Os cromatogramas para cada grupo tiveram aspecto similar entre si. Em geral, houve eluição dos peptídeos no tempo entre 14 e 52 minutos. O padrão de eluição, entretanto, foi um pouco distinto para os diferentes grupos. Para o esmalte 10 minutos (Figura 8A), a eluição foi relativamente constante ao longo do tempo, enquanto que para o esmalte 120 minutos, dentina 10 minutos e dentina 120 minutos, a eluição foi mais concentrada nos tempos de retenção iniciais (entre 14 e 30 minutos) (Figuras 8B, 9A e 9B, respectivamente).



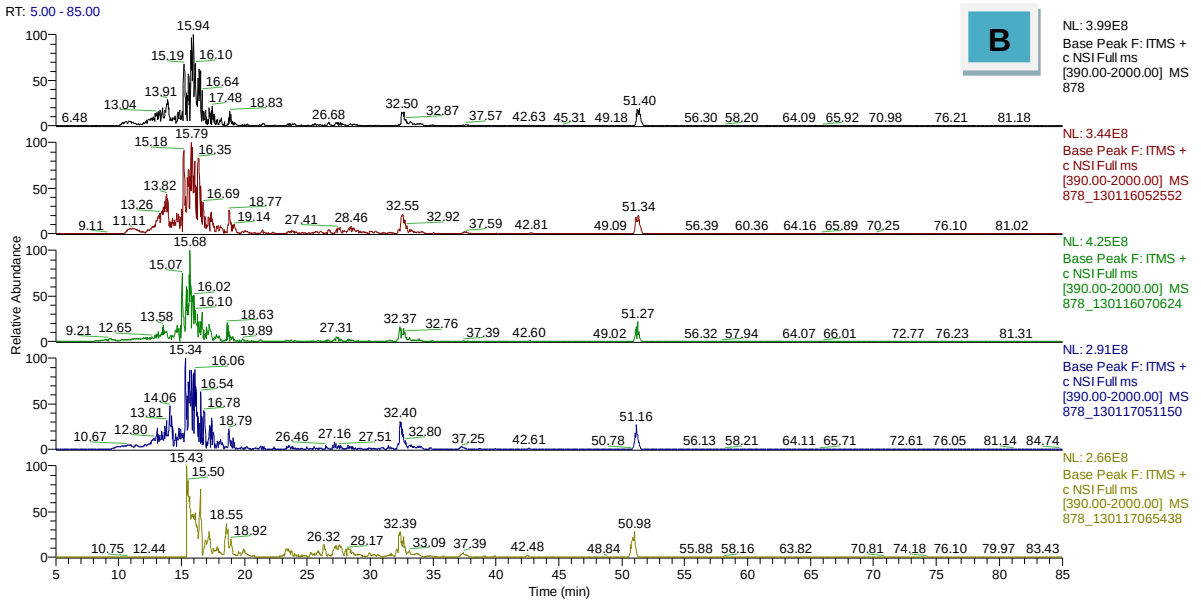


Figura 8 - Cromatograma base-pico de cada grupo estudado. **(A)** *pool* de amostras de película adquirida do esmalte formada no tempo de 10 minutos. **(B)** *pool* de película adquirida do esmalte formada no tempo de 2 horas. A separação de peptídeos foi sucedida utilizando coluna de cromatografia líquida de fase reversa com nano fluxo, e gradiente de eluição variando de 0 a 100% de solvente B em 85 minutos.

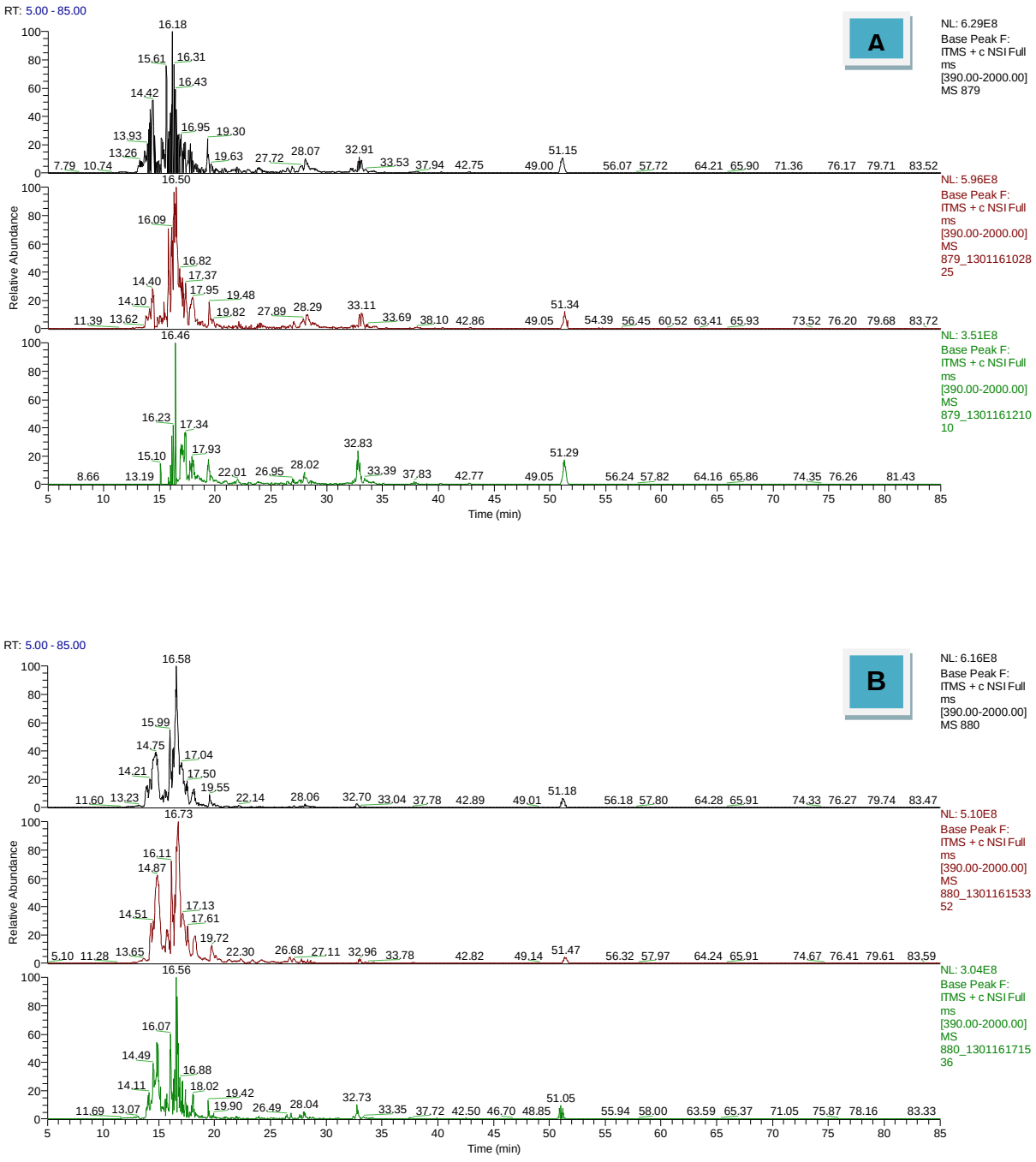


Figura 9 - Exemplo de cromatograma base-pico de cada grupo estudado. **(A)** *pool* de película adquirida da dentina formada no tempo de 10 minutos. **(B)** *pool* de película adquirida da dentina formada no tempo de 2 horas. A separação de peptídeos foi sucedida utilizando coluna de cromatografia líquida de fase reversa com nano fluxo, e gradiente de eluição variando de 0 a 100% de solvente B em 85 minutos.

Os íons peptídeos obtidos foram identificados através da busca no banco de dados utilizando o algoritmo SEQUEST, seguindo os critérios descritos nos métodos**.** Um total de 290 proteínas diferentes foi identificado a partir da PA formada *in situ*. A identificação de proteínas foi diferente de acordo com os tempos de formação da película e substratos, sendo maior para o esmalte que para a dentina, e para o tempo de 10 minutos, comparado ao tempo de 2 horas. Para o esmalte 10 minutos, esmalte 2 horas, dentina 10 minutos e dentina 2 horas, o número de proteínas identificadas foi 160, 64, 86 e 52, respectivamente. As Figuras 10 e 11 mostram a distribuição do número de proteínas identificadas, de acordo com o tempo de formação da PA para o esmalte e dentina, respectivamente.

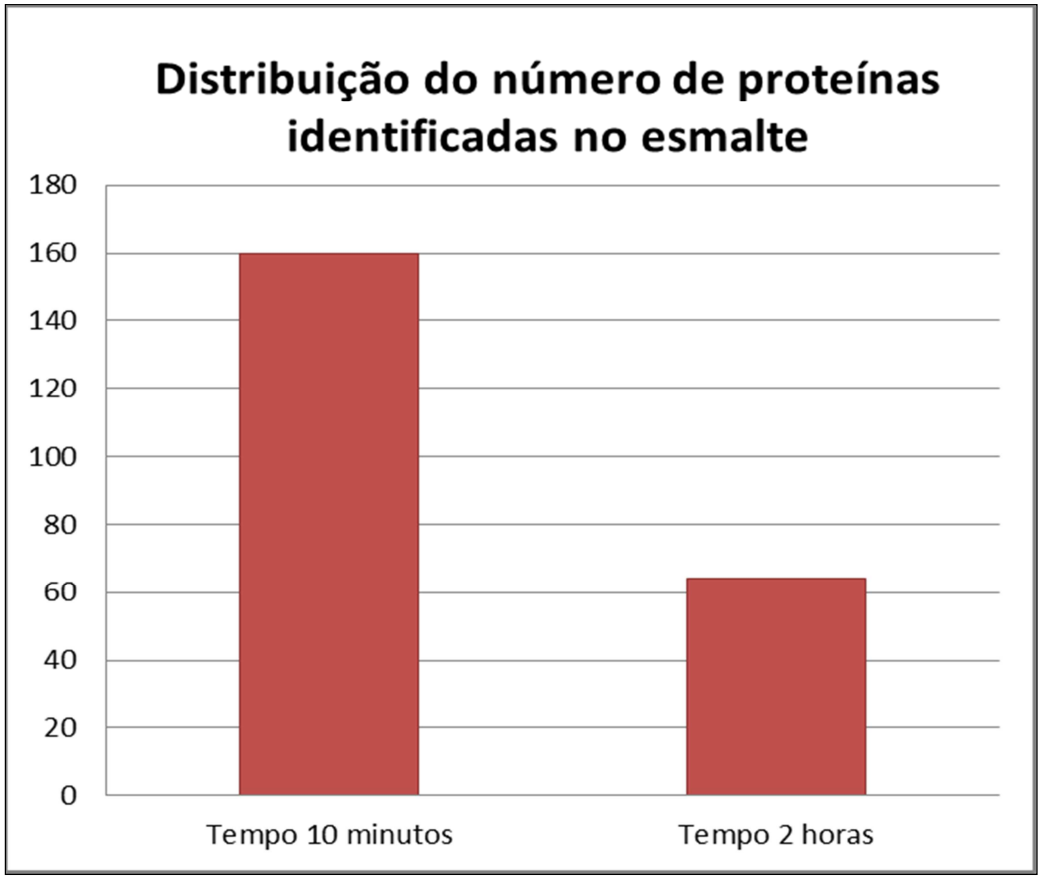


Figura 10 - Distribuição do número de proteínas identificadas a partir da PA formada sobre o esmalte em diferentes tempos.

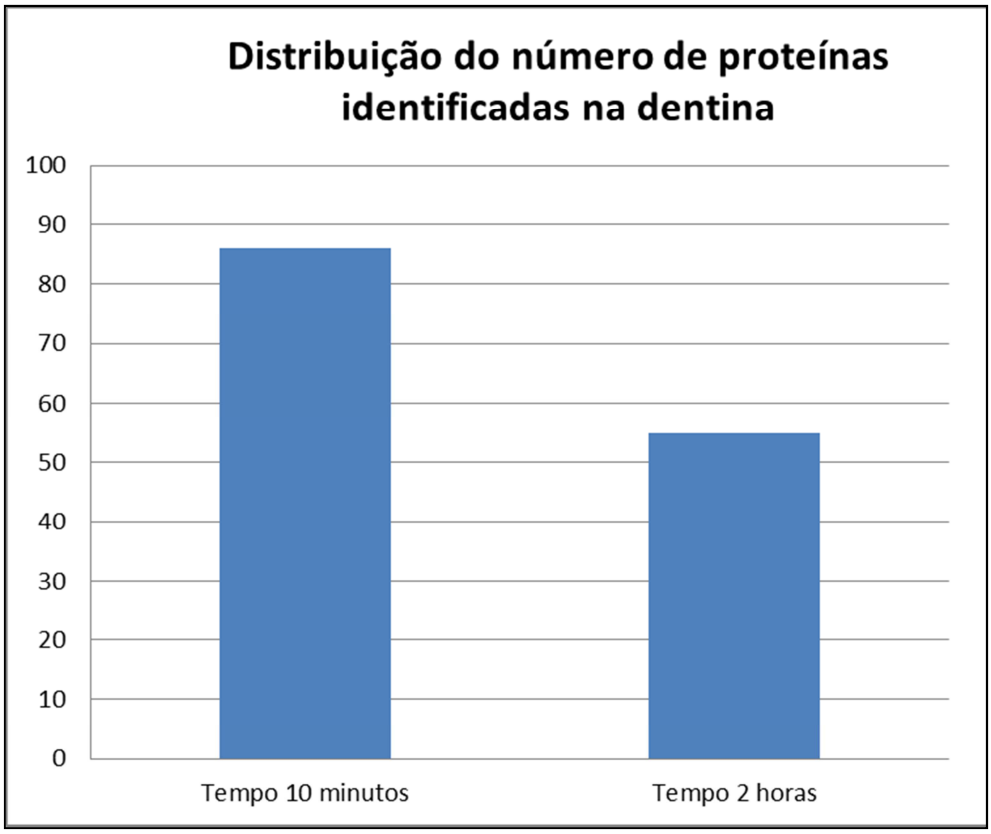


Figura 11. Distribuição do número de proteínas identificadas a partir da PA formada sobre a dentina em diferentes tempos.

No presente trabalho, o número de proteínas identificadas no tempo de 10 minutos foi bem maior que aquele observado no tempo de 120 minutos, tanto para o esmalte quanto para a dentina, sendo esta diferença mais pronunciada para o esmalte. Há apenas um estudo na literatura até o momento que relata o perfil proteômico em PAs formada sobre o esmalte em diferentes tempos. Os autores coletaram PA formada *in vivo* sobre o esmalte em tempos de 5 minutos, 10 minutos, 1 hora e 2 horas e identificaram 89, 92, 107 e 101 proteínas, respectivamente (LEE, Y.H. et al., 2013).

Estes dados diferem do presente trabalho, no qual, para o esmalte, nos tempos de formação de 10 minutos e 2 horas foram identificadas 160 e 64 proteínas, respectivamente, ou seja, houve uma grande diminuição no número de proteínas identificadas na PA de 2 horas. As razões para esta diferença podem ser os diferentes protocolos de coleta de PA empregados nestes 2 estudos, já que os procedimentos de análise proteômica foram estritamente os mesmos. No trabalho de LEE et al., (2013) a PA foi coletada *in vivo* de dentes naturais, enquanto que no presente trabalho a coleta foi *in situ,* de blocos de esmalte (3X3 mm), reduzindo

assim a área disponibilizada para a formação da PA. Isto poderia ajudar explicar o número menor de proteínas identificadas a partir da PA formada sobre o esmalte no tempo de 2 horas, mas não o maior número de proteínas identificadas na PA formada sobre este mesmo substrato no tempo de 10 minutos no presente trabalho. Outra diferença relativa ao procedimento de coleta da PA foi que no presente estudo, para redução da proteólise das amostras, o procedimento da coleta foi modificado em relação a estudos *in vivo* anteriores (SANTOS, 2013; LEE et al., 2013; ZIMMERMAN et al., 2013; SIQUEIRA et al., 2010; SIQUEIRA ; OPPENHEIM, 2009; SIQUEIRA et al., 2007b) pelo fato de se ter adicionado 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 o inibidor de protease possa ter interferido nos resultados. Em relação ao número de proteínas identificadas na PA formada sobre a dentina, não é possível tecer comparações com a literatura, pois o presente trabalho é pioneiro neste sentido.

No presente estudo foram identificadas proteínas descritas na PA em estudos prévios *in vivo* utilizando a mesma técnica proteômica tais como, estaterina, PRPs, cistatinas, mucinas e anexina, entre outras (LEE, Y.H. et al., 2013; SIQUEIRA et al., 2007a; SIQUEIRA et al., 2010; SIQUEIRA; OPPENHEIM, 2009; ZIMMERMAN et al., 2013). Todas as proteínas descritas no presente estudo foram identificadas por no mínimo dois peptídeos distintos e apareceram em pelo menos três corridas de cada grupo. As tabelas 1, 2, 3 e 4 mostram as proteínas identificadas para o esmalte 10 minutos, esmalte 2 horas, dentina 10 minutos e dentina 2 horas, respectivamente, com o *score* de identificação, cobertura, peso molecular e ponto isoelétrico.

Para o grupo de esmalte 10 minutos, a taxa de identificação foi alta, com a identificação de proteínas clássicas como a anidrase carbônica, anexina, mucinas, cistatina, PRP e estaterina, contudo com a ausência de outras proteínas clássicas, tais com histatinas e alfa amilase (LEE, Y.H. et al., 2013; SIQUEIRA et al., 2007b). No grupo de esmalte 2 horas, a taxa de identificação foi ligeiramente reduzida em relação aos trabalhos realizados *in vivo*, com ausência de proteínas clássicas como alfa amilase, histatina e PRPs. Dentre as proteínas consideradas clássicas na PA do esmalte, foram identificada cistatina, estaterina e várias isoformas de mucinas. Um fato que chamou a atenção, dentre as proteínas identificadas na PA do esmalte, foi à presença de várias proteínas não caracterizadas, que foi mais abundante para o

tempo de formação de 10 minutos. Em adição, algumas das proteínas inicialmente identificadas foram deletadas, após conferência do número de acesso no UNIPROT.

Em geral, os resultados de identificação podem ser considerados satisfatórios. Entretanto, para uma melhoria na identificação de proteínas, bem como para se obter uma maior identificação de proteínas classicamente descritas na PA do esmalte, poder-se-ia pensar em realizar a coleta sem a utilização do inibidor de proteases adicionado ao ácido cítrico 3%, bem como formação da PA *in vivo* ou ainda *in situ*, empregando um maior número de blocos de esmalte ou blocos de esmalte maiores, para aumentar a área superficial de contato com a saliva.

Tabela 1. Proteínas presentes na PA formada *in situ* sobre o esmalte no tempo de 10 minutos.

Nº de Acesso	Nome da proteína	Score	Coverage	#AAs	PM [kDa]	pI
Q712M9	5-hydroxytryptamine receptor 4	11,36	7.24	428	48,2	8,18
H0YEJ5	7-dehydrocholesterol reductase	6,60	26,94	245	27,6	9,36
Q8TE57	A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 16	5,60	3,51	1224	136,1	8,63
P60709	Actin, cytoplasmic 1	11,49	13,60	375	41,7	5,48
A7E242	A-kinase anchor protein 6	7,68	6,23	1075	120,2	5,10
P04083	Annexin A1	16,34	10,12	346	38,7	7,02
B5BU38	Annexin	16,34	10,12	346	38,7	7,02
H0YHB1	Arf-GAP with GTPase, ANK repeat and PH domain-containing protein 2	3,19	5,92	169	18,5	10,43
H0YBF7	Arf-GAP with SH3 domain, ANK repeat and PH domain-containing protein 1	5,09	3,37	950	105,2	7,40
Q09428	ATP-binding cassette sub-family C member 8	6,36	3,73	1581	176,9	7,81
Q562R1	Beta-actin-like protein 2	11,69	7,18	376	42,0	5,59
Q2F3K1	Calcium sensing receptor	6,63	6,79	501	55,9	7,64
G3V4C0	Calmin	6,72	26,32	133	14,5	9,63
Q9UBL0	cAMP-regulated phosphoprotein 21	12,81	3,45	812	89,1	6,95
P23280	Carbonic anhydrase 6	2,64	2,92	308	35,3	7,02
A7LI12	Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 16	24,24	9,18	425	45,8	6,35
Q8N3K9	Cardiomyopathy-associated protein 5	6,30	1,47	4069	448,9	4,78
H0YDW7	CD44 antigen	6,65	29,17	240	26,0	5,29
P01036	Cystatin-S	8,85	12,77	141	16,2	5,02
O94875	Sorbin and SH3 domain containing 2	12,32	5,00	1200	134,4	8,53
B3KS48	cDNA FLJ35471 fis, clone SMINT2006708, highly similar to Homo sapiens ubiquitin specific peptidase 31 (USP31)	6,35	10,39	645	68,2	10,18
Q8N903	cDNA FLJ38624 fis, clone HEART2008994	9,24	10,94	457	49,5	9,35
B3KVY2	cDNA FLJ41718 fis, clone HLUNG2013097, highly similar to SPLICING FACTOR, ARGININE/SERINE-RICH 2	7,71	9,74	195	22,4	11,63
B4DMX2	cDNA FLJ51250, highly similar to Plasma kallikrein (EC 3,4,21,34)	6,28	12,45	514	57,6	8,34
B7Z3F1	cDNA FLJ52429, weakly similar to LIM domain only protein 7	6,47	5,36	821	92,8	6,98
B4DNT7	cDNA FLJ53070, highly similar to Macrosialin	6,50	8,24	340	36,0	8,87
B4DS89	cDNA FLJ53091, highly similar to GDNF family receptor alpha-2	6,82	14,20	331	36,4	8,15
B4E0F0	cDNA FLJ53428, highly similar to Disco-interacting protein 2 homolog A	6,35	6,04	1110	119,4	8,24
B4DJU9	cDNA FLJ55278, highly similar to AF4/FMR2 family member 1	6,48	7,18	849	91,6	9,42
B4DRW1	cDNA FLJ55805, highly similar to Keratin, type II cytoskeletal 4	15,80	4,43	474	51,7	6,81
B7Z3E7	cDNA FLJ56510, highly similar to Tumor suppressor p53-binding protein 1	5,82	2,78	1760	189,8	4,69
B4E0U5	cDNA FLJ56707, highly similar to Serine/threonine-protein kinase	6,59	21,83	284	31,3	9,73
B7Z2A6	Liprin-alpha-2	3,50	1,56	1152	131,4	6,70
B4DR10	Rho-GTPase-activating protein 7	6,51	6,59	1017	114,1	7,77
B7Z759	cDNA FLJ61672, highly similar to Proteoglycan-4	6,00	4,87	904	94,8	9,42
Q14511	Enhancer of filamentation 1	4,56	3,72	834	92,9	6,70
A8K5R2	cDNA FLJ77293, highly similar to Homo sapiens vasohibin 1 (VASH1), mRNA	329,57	17,81	365	40,9	9,54

A8K8U1	cDNA FLJ77762, highly similar to Homo sapiens cullin-associated and neddylation-dissociated 1 (CAND1), mRNA	6,59	4,39	1230	136,2	5,83
B4DWY9	cDNA FLJ53625, moderately similar to WD repeat and FYVE domain-containing protein 3	8,71	7,05	624	69,2	7,30
A8K2I0	cDNA FLJ78504, highly similar to Homo sapiens keratin 6A (KRT6A), mRNA	13,65	6,91	564	60,0	8,00
F5H2E2	CLIP-associating protein 1	5,91	2,97	1245	136,6	8,79
Q8IWY9	Codanin-1	5,28	2,61	1227	134,0	6,77
Q02388	Collagen alpha-1(VII) chain	5,86	1,70	2944	295,0	6,27
B3KQY9	DNA-directed RNA polymerase	4,75	6,69	523	58,8	7,25
B3KRQ8	DNA-directed RNA polymerase	13,04	5,01	838	94,3	8,46
Q63HN8	E3 ubiquitin-protein ligase RNF213	9,57	0,96	5207	591,0	6,48
Q5XX13	F-box/WD repeat-containing protein 10	8,04	1,71	1052	119,8	9,39
Q5CZC0	Fibrous sheath-interacting protein 2	6,42	0,58	6907	780,1	6,71
F8W9W2	G protein-coupled receptor kinase 6	6,53	1,66	542	62,2	8,10
E7EV53	Gamma-aminobutyric acid receptor subunit alpha-6	5,79	10,84	443	49,7	8,41
E7EV50	Gamma-aminobutyric acid receptor subunit beta-2	9,61	5,11	411	47,5	9,16
C9J3Q2	Glutaminase liver isoform, mitochondrial	5,65	19,02	184	20,3	10,08
H0Y6I0	Golgin subfamily A member 4	5,71	2,33	2099	246,5	5,39
Q86Y00	GTF2IRD2B protein	9,89	11,26	444	50,8	7,43
O14686	Histone-lysine N-methyltransferase 2D	7,28	1,25	5537	593,0	5,58
P10915	Hyaluronan and proteoglycan link protein 1	10,75	10,17	354	40,1	7,42
P01591	Immunoglobulin J chain	9,71	51,09	137	15,6	4,73
D6RHJ6	Immunoglobulin J chain	6,27	29,94	157	17,7	6,32
Q9H1B7	Interferon regulatory factor 2-binding protein-like	6,70	9,67	796	82,6	8,24
H6VRG2	Keratin 1	24,67	8,54	644	66,0	8,12
A1A4E9	Keratin 13	40,28	9,61	458	49,6	4,96
P13646	Keratin, type I cytoskeletal 13	107,70	9,61	458	49,6	4,96
P02533	Keratin, type I cytoskeletal 14	11,35	7,42	472	51,6	5,16
P04264	Keratin, type II cytoskeletal 1	7,83	5,28	644	66,0	8,12
P02538	Keratin, type II cytoskeletal 6A	17,93	3,72	564	60,0	8,00
A5YKK5	KIAA0232	5,74	2,65	1395	154,7	4,78
Q5T7N2	LINE-1 type transposase domain-containing protein 1	4,99	3,01	865	98,8	4,93
Q13136	Liprin-alpha-1	6,64	4,16	1202	135,7	6,29
Q8TDL5	BPI fold-containing family B member 1	4,74	8,68	484	52,4	7,23
Q5TCQ9	Membrane-associated guanylate kinase, WW and PDZ domain-containing protein 3	4,41	2,12	1506	165,5	8,02
F8WEW5	Membrane-associated phosphatidylinositol transfer protein 3	5,87	3,09	938	102,6	7,66
H7C066	Methyl-CpG-binding domain protein 5 (Fragment)	5,80	4,42	1064	111,7	9,55
G3CIG0	MUC19 variant 12	14,10	1,63	8384	804,8	5,01
A0T3F4	Mucin 4	23,24	3,90	1437	151,9	6,80
Q8WXI7	Mucin-16	33,24	1,59	22152	2351,2	6,00
B5ME49	Mucin-16	12,59	0,55	14507	1518,2	5,26
Q9HC84	Mucin-5B	6,37	0,79	5703	590,1	6,67
Q6W4X9	Mucin-6	5,77	1,97	2439	256,9	7,39
G3CIH4	MUC19 variant 17 (Fragment)	3,23	12,41	282	29,5	4,82
G3CIH6	MUC19 variant 19 (Fragment)	3,20	9,80	296	30,6	4,73
Q9Y3S4	MUC-B1 protein (Fragment)	3,10	27,35	117	12,5	9,82
P98088	Mucin-5AC (Fragments)	3,55	0,56	5030	526,3	6,90

A8MX12	Myomesin-1	6,72	4,63	1685	187,6	6,98
A6NIU4	Myomesin-3	5,74	3,29	1214	136,4	6,62
Q92827	Myosin-ID	27,47	10,47	401	44,6	5,22
E9PAV3	Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha	6,31	4,43	2078	205,3	9,58
H0YA93	NEDD4-binding protein 2	6,88	4,29	1400	158,1	5,82
A2A2V2	RNA-binding protein 34	12,65	9,56	408	45,9	10,08
B7Z9A6	N-sulphoglucosamine sulphohydrolase	6,31	13,17	205	21,6	11,40
Q6P4R8	Nuclear factor related to kappa-B-binding protein	5,81	2,69	1299	138,9	9,25
C9JCR8	Nuclear receptor coactivator 3	4,94	2,30	1350	147,4	7,05
Q05BP9	OLIG2 protein	6,44	10,74	270	27,3	9,41
Q8NDF8	PAP-associated domain-containing protein 5	6,38	11,89	572	63,2	8,98
Q9GZU2	Paternally-expressed gene 3 protein	7,70	1,45	1588	180,7	5,48
Q8NEN9	PDZ domain-containing protein 8	21,31	2,86	1154	128,5	6,09
Q96Q06	Perilipin-4	13,12	5,38	1357	134,3	8,73
Q7Z443	Polycystic kidney disease protein 1-like 3	6,97	3,75	1732	195,8	8,48
A5A3E0	POTE ankyrin domain family member F	19,69	3,16	1075	121,4	6,20
Q32Q83	PPIL4 protein	5,18	9,56	387	44,2	5,11
Q9Y4D8	Probable E3 ubiquitin-protein ligase HECTD4	12,12	1,03	3996	439,1	6,19
P12273	Prolactin-inducible protein	12,47	13,70	146	16,6	8,05
Q9UPA5	Protein bassoon	9,74	1,73	3926	416,2	7,55
Q8N807	Protein disulfide-isomerase-like protein of the testis	13,41	3,60	584	66,6	6,86
Q9H7U1	Serine-rich coiled-coil domain-containing protein 2	6,56	7,19	834	93,5	6,87
Q9ULI3	Protein HEG homolog 1	6,90	4,27	1381	147,4	6,18
Q9Y5I3	Protocadherin alpha-1	41,56	4,74	950	102,9	5,15
A2A3N6	Putative PIP5K1A and PSMD4-like protein	6,51	3,02	862	95,0	5,71
Q9C0F0	Putative Polycomb group protein ASXL3	6,02	1,82	2248	241,8	6,14
Q5JV90	Putative uncharacterized protein DKFZp564P1772	6,80	6,85	934	103,9	8,15
Q63HQ7	Putative uncharacterized protein DKFZp686A1736	7,20	5,83	1114	124,8	5,97
Q6MZW0	Putative uncharacterized protein DKFZp686J11235	6,54	13,83	506	54,4	6,77
E9PL31	Proline-rich protein 18 (Fragment)	2,59	16,24	117	11,9	11,94
E7EX08	Regulating synaptic membrane exocytosis protein 1	13,39	5,73	1291	144,3	9,28
G3V112	Regulator of G-protein signaling 22	10,68	1,94	1083	126,1	8,21
A0PJ83	REST protein	6,04	10,22	460	52,2	8,34
Q59HG6	Rho GTPase activating protein 6 isoform 1 variant	11,84	1,92	729	79,7	8,97
B3KX27	Rhophilin-2	6,00	11,30	416	46,6	8,24
B1APS8	Ribosomal protein S6 kinase delta-1	6,87	6,64	1054	117,2	4,87
H0YGL9	Ryanodine receptor 2	7,57	0,85	4951	562,5	6,11
Q15413	Ryanodine receptor 3	23,62	0,49	4870	551,7	5,68
Q6UWB4	Serine protease 55	6,61	10,23	352	38,8	7,53
Q8IYB3	Serine/arginine repetitive matrix protein 1	14,60	3,65	904	102,3	11,84
Q96Q15	Serine/threonine-protein kinase SMG1	7,71	1,56	3661	410,2	6,46
Q9Y6X0	SET-binding protein	4,14	1,50	1596	174,9	9,74
E7ET49	Sn1-specific diacylglycerol lipase beta	7,12	11,25	631	68,9	6,55
Q5SXM2	snRNA-activating protein complex subunit 4	6,53	3,27	1469	159,3	8,28
Q7RTM4	Spectrin-like protein of the nuclear envelope and Golgi	9,14	0,37	8407	965,7	5,55
Q76KD6	Speriolin	8,57	3,72	591	62,4	8,19
E7END2	Sperm-specific antigen 2	22,44	1,94	1084	119,1	5,34
B3KUY1	Splicing factor, arginine/serine-rich 2, isoform CRA_d	9,13	6,70	209	24,2	11,94

P02808	Statherin	17,53	53,23	62	7,3	8,47
Q7Z7G0	Target of Nesh-SH3	6,66	5,40	1075	118,6	9,44
O60343	TBC1 domain family member 4	5,89	3,70	1298	146,5	7,01
G3V470	Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate 3-phosphatase and dual-specificity protein phosphatase PTEN	4,62	1,96	1481	166,8	8,92
E7ERH1	Tensin-1	13,24	6,67	780	85,6	7,42
D3DPG0	Titin, isoform CRA_a	16,44	0,35	34942	3878,8	6,38
Q6PRX2	Transducin-like enhancer of split 3 splice variant 2	8,28	7,56	767	82,8	7,20
H0Y2M0	Transmembrane protein 131-like	11,67	2,09	1387	154,6	6,76
Q9HCJ0	Trinucleotide repeat-containing gene 6C	6,95	2,96	1690	175,9	6,96
Q9H2D6	TRIO and F-actin-binding protein	6,85	1,90	2365	261,2	8,48
B4DIL8	Tuberin	10,38	6,32	1692	187,8	6,93
Q6ZU65	Ubinuclein-2	10,04	3,34	1347	146,0	9,19
D3DVA8	Ubiquilin 4, isoform CRA_a	6,43	8,98	423	46,0	4,79
B7WPF4	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase	8,29	3,13	2460	277,2	6,28
F4MH43	Ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat protein Y-linked transcript variant 4	7,82	3,98	955	105,1	7,78
E1U1M3	Ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat protein Y-linked transcript variant 47	26,40	6,41	1342	148,9	7,55
A6NGG8	Uncharacterized protein C2orf71	7,84	4,81	1288	139,6	8,07
Q9UF83	Uncharacterized protein DKFZp434B061	6,24	9,04	564	59,4	13,07
Q8N7P7	Uncharacterized protein FLJ40521	5,91	9,96	452	48,3	9,94
Q9Y2F5	Uncharacterized protein KIAA0947	7,12	1,90	2266	247,7	5,48
Q96PY0	Uncharacterized protein KIAA1908	6,64	24,62	264	28,2	11,15
Q5HYC2	Uncharacterized protein KIAA2026	8,98	3,57	2103	227,9	9,04
O75445	Usherin	9,58	1,63	5202	575,2	6,83
Q6IRT0	USP32 protein	4,54	7,08	367	40,7	6,68
B7Z6A0	UV radiation resistance-associated gene protein	8,43	20,78	255	27,5	5,64
A4UGR9	Xin actin-binding repeat-containing protein 2	42,49	1,22	3374	382,1	6,38
Q9ULM3	YEATS domain-containing protein 2	7,26	4,78	1422	150,7	8,98
P15822	Zinc finger protein 40	5,10	1,21	2718	296,7	7,84
Q59FE0	Zinc finger protein 41 variant	9,91	9,31	698	80,2	9,01
O43149	Zinc finger ZZ-type and EF-hand domain-containing protein 1	6,51	2,13	2961	330,9	5,95

Tabela 2. Proteínas presentes na PA formada *in situ* sobre o esmalte no tempo de 2 horas.

Nº de Acesso	Nome da proteína	Score	Coverage	#AAs	PM [kDa]	pI
C9JLQ8	Adipocyte enhancer-binding protein 1	5,11	15,43	162	18,1	9,32
Q5Y190	Anchor protein	8,09	0,86	4186	453,0	6,83
B7ZLW1	CAMSAP1 protein	8,34	2,86	1467	163,2	6,95
Q8N4F0	BPI fold-containing family B member 2	4,97	10,04	458	49,1	8,72
B4DTX1	cDNA FLJ53196, highly similar to SAM and SH3 domain-containing protein 1	6,41	4,75	695	76,5	6,60
B7Z582	cDNA FLJ53638, highly similar to Annexin A6	3,14	5,48	547	61,8	5,54
B7Z6W9	cDNA FLJ54555	9,38	15,67	300	33,6	9,09
A8K2H9	cDNA FLJ78503, highly similar to Homo sapiens keratin 13 (KRT13), transcript variant 1, mRNA	6,37	14,41	458	49,5	4,92
P00450	Ceruloplasmin	3,15	1,88	1065	122,1	5,72
Q14781	Chromobox protein homolog 2	5,85	9,02	532	56,0	10,01
P01036	Cystatin-S	7,76	12,77	141	16,2	5,02
D3DRA2	Collagen, type XVII, alpha 1, isoform CRA_b	6,70	1,80	1497	150,4	8,79
Q9BXJ5	Complement C1q tumor necrosis factor-related protein 2	11,40	5,96	285	29,9	8,87
P01024	Complement C3	4,89	2,47	1663	187,0	6,40
B0I1S0	DYNC2H1 variant protein	6,14	0,86	4307	492,3	6,52
Q9P2D7	Dynein heavy chain 1, axonemal	9,20	0,48	4330	493,6	5,94
E9PHM6	Dystonin	4,69	0,22	5457	624,6	5,72
P22681	E3 ubiquitin-protein ligase CBL	6,57	3,64	906	99,6	6,54
A2RUE7	Glutamate receptor, ionotropic, N-methyl-D-aspartate 3A	5,41	3,23	1115	125,5	7,77
Q9NR48	Histone-lysine N-methyltransferase ASH1L	9,92	1,62	2969	332,6	9,39
P01876	Ig alpha-1 chain C region	3,19	10,76	353	37,6	6,51
Q96T68	Histone-lysine N-methyltransferase SETDB2	9,63	8,21	719	81,8	7,50
A1A4E9	Keratin 13	9,38	12,66	458	49,6	4,96
P13646	Keratin, type I cytoskeletal 13	19,18	12,66	458	49,6	4,96
Q2XSU5	KIR3DL2 (Fragment)	12,50	10,93	421	46,6	8,51
Q19KS2	Lactoferrin (Fragment)	2,25	2,55	353	39,1	9,03
E9PGE3	LIM/homeobox protein Lhx8	6,22	13,87	346	38,1	8,16
Q9NR99	Matrix-remodeling-associated protein 5	11,21	2,26	2828	312,0	8,32
Q6NUQ9	Mitogen-activated protein kinase 8 interacting protein 1	6,75	6,47	711	77,4	4,98
E9PR05	Histone-lysine N-methyltransferase MLL	4,85	2,43	1439	155,4	10,36
G3CIG0	MUC19 variant 12	6,42	0,82	8384	804,8	5,01
B5ME49	Mucin-16	24,88	1,43	14507	1518,2	5,26
Q7Z5P9	Mucin-19	6,48	0,85	6254	597,8	5,00
E7EPM4	Mucin-17	3,11	0,75	4262	425,3	4,03
H0Y2Y1	Mucin-4 beta chain	20,02	21,53	144	15,4	10,81
H7BYZ0	Mucin-5B	6,64	1,28	5528	574,3	6,80
Q8N6B4	Myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia/clathrin assembly protein fusion protein	4,25	6,01	599	63,4	9,26
Q92827	Myosin-ID (Fragment)	7,99	10,47	401	44,6	5,22
Q5T321	Neurobeachin	5,82	1,29	2943	327,3	6,16
Q9P242	Neuronal tyrosine-phosphorylated phosphoinositide-3-kinase adapter 2	6,79	6,74	653	70,5	8,48
A2A2V2	RNA-binding protein 34	22,40	5,39	408	45,9	10,08

P16234	Platelet-derived growth factor receptor alpha	6,40	0,92	1089	122,6	5,17
Q9UPA5	Protein bassoon	6,21	1,25	3926	416,2	7,55
Q8N807	Protein disulfide-isomerase-like protein of the testis	6,48	3,60	584	66,6	6,86
Q659A9	Putative uncharacterized protein DKFZp547I0910	7,61	3,54	819	93,6	7,90
Q6MZK8	Putative uncharacterized protein DKFZp686K06110	5,20	2,28	2060	226,3	4,44
Q6GYQ0	Ral GTPase-activating protein subunit alpha-1	10,89	0,49	2036	229,7	6,19
B4DJW3	Renalase	14,62	25,00	232	25,8	5,86
E7EVZ3	Retinoic acid-induced protein 1	6,01	1,95	1640	175,3	9,14
Q15413	Ryanodine receptor 3	11,65	0,49	4870	551,7	5,68
Q8IYB3	Serine/arginine repetitive matrix protein 1	25,79	3,65	904	102,3	11,84
C9J6S8	Serine/threonine-protein kinase 19	10,04	20,54	112	12,3	11,00
Q9NQU5	Serine/threonine-protein kinase PAK 6	8,97	3,38	681	74,8	9,52
Q8IYT8	Serine/threonine-protein kinase ULK2	6,58	5,60	1036	112,6	8,53
O75691	Small subunit processome component 20 homolog	7,63	0,90	2785	318,2	7,39
E7END2	Sperm-specific antigen 2	13,89	5,26	1084	119,1	5,34
P02808	Statherin	3,28	48,39	62	7,3	8,47
E7ERH1	Tensin-1	9,73	4,10	780	85,6	7,42
D3DPG0	Titin, isoform CRA_a	31,51	0,50	34942	3878,8	6,38
G3V220	Transcription elongation regulator 1, isoform CRA_c	3,29	1,65	1032	116,1	8,46
A4UGR9	Xin actin-binding repeat-containing protein 2	56,56	1,66	3374	382,1	6,38
B2RBP0	Zinc finger and BTB domain containing 40, isoform CRA_a	5,78	11,96	418	47,1	7,39
O60293	Zinc finger C3H1 domain-containing protein	8,11	2,11	1989	226,2	8,13
Q6AHZ1	Zinc finger protein 518A	6,87	5,12	1483	166,7	9,28

As proteínas identificadas para a dentina, nos tempos de formação de 10 minutos e 2 horas estão listadas nas tabelas 3 e 4, respectivamente. O número de proteínas identificadas para o tempo de 10 minutos de formação da PA (86 proteínas) foi bastante reduzido em relação àquele observado para o esmalte no presente trabalho, no mesmo tempo de formação, mas foi bastante parecido com o número de proteínas identificado a partir da película formada *in vivo* sobre o esmalte, no tempo de 10 minutos (92 proteínas; (LEE, Y.H. et al., 2013). Foram observadas proteínas classicamente identificadas no esmalte em outros estudos proteômicos, como anexina, cistatina, anidrase carbônica, imunoglobulinas e várias isoformas de mucina, mas não foram detectadas outras proteínas clássicas, tais como estaterina, PRPs, histatinas e alfa amilase (LEE, Y.H. et al., 2013; SIQUEIRA et al., 2007b). Já para o tempo de formação de 2 horas, como observado para o esmalte, houve redução no número de proteínas identificadas (52).

Dentre as proteínas identificadas destacam-se isoformas de anexina, mucina, lactoperoxidase, anidrase carbônica e colágeno. Também foram observadas proteínas não caracterizadas na PA de dentina (9 para o tempo de 10 minutos e 3 para o tempo de 2 horas de formação). Seria interessante, como sugerido para o esmalte, coletar película formada sobre a dentina *in vivo.* Isto poderia ser feito em pacientes portadores de recessão gengival ou com lesões cervicais não cariosas, por exemplo.

Tabela 3. Proteínas presentes na PA formada *in situ* sobre a dentina no tempo de 10 minutos.

Nº de acesso	Nome da proteína	Score	Coverage	#AAs	PM [kDa]	pI
P60709	Actin, cytoplasmic 1	32,92	12,27	375	41,7	5,48
H7C3S1	Actin-binding protein anillin	10,96	15,25	236	26,6	9,47
P04083	Annexin A1	16,81	10,12	346	38,7	7,02
B5BU38	Annexin	16,81	10,12	346	38,7	7,02
Q6WG78	Antigen MLAA-14	9,61	23,44	256	28,5	6,27
F8VZK3	Calcium/calmodulin-dependent 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase 1B	6,70	10,99	191	21,4	8,85
B7ZLW1	CAMSAP1 protein	16,86	5,73	1467	163,2	6,95
P23280	Carbonic anhydrase 6	3,12	2,92	308	35,3	7,02
Q8NAT4	cDNA FLJ34815 fis, clone NT2NE2007786	4,76	21,43	154	16,5	11,90
B4DWU6	cDNA FLJ51361, highly similar to Keratin, type II cytoskeletal 6A	38,84	4,04	520	55,8	6,48
B4DZC0	cDNA FLJ51771, highly similar to SWI/SNF-related matrix-associatedactin-dependent regulator of chromatin subfamily A member5	9,28	4,42	995	116,7	8,34
B4DL23	cDNA FLJ53512, highly similar to Homo sapiens centrosomal protein 170 kDa (CEP170), transcript variant alpha, mRNA	6,49	4,50	911	101,7	6,64
B4DRW1	cDNA FLJ55805, highly similar to Keratin, type II cytoskeletal 4	51,93	15,40	474	51,7	6,81
B4E187	cDNA FLJ60083, highly similar to Zinc finger protein 638 (Fragment)	6,17	5,68	880	97,2	7,56
A8K2H9	cDNA FLJ78503, highly similar to Homo sapiens keratin 13 (KRT13), transcript variant 1, mRNA	80,14	19,43	458	49,5	4,92
O14646	Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 1	19,80	3,92	1710	196,6	7,14
P48444	Coatomer subunit delta	13,97	17,42	511	57,2	6,21
P01024	Complement C3	5,26	2,41	1663	187,0	6,40
P01036	Cystatin-S	3,90	12,77	141	16,2	5,02
E9PPH6	Exophilin-5	13,25	5,31	1733	193,0	8,46
D3DX70	GRIP and coiled-coil domain containing 2, isoform CRA_a	16,00	2,08	1583	184,5	5,10
G5EA02	HCG21296, isoform CRA_c	6,88	2,47	2104	236,5	6,16
Q9NR48	Histone-lysine N-methyltransferase ASH1L	6,81	1,58	2969	332,6	9,39
P10915	Hyaluronan and proteoglycan link protein 1	8,33	10,17	354	40,1	7,42
P01877	Ig alpha-2 chain C region	1,59	2,06	340	36,5	6,10
P01857	Ig gamma-1 chain C region	3,36	4,24	330	36,1	8,19
P01861	Ig gamma-4 chain C region	3,10	9,48	327	35,9	7,36
Q93033	Immunoglobulin superfamily member 2	4,91	3,33	1021	115,0	6,96
Q59EZ3	Insulin-like growth factor 2 receptor variant	4,72	0,62	2414	265,9	5,83
P13646	Keratin, type I cytoskeletal 13	132,56	14,63	458	49,6	4,96
P02533	Keratin, type I cytoskeletal 14	9,72	3,81	472	51,6	5,16
P04264	Keratin, type II cytoskeletal 1	16,62	3,73	644	66,0	8,12

P02538	Keratin, type II cytoskeletal 6A	38,84	3,72	564	60,0	8,00
Q9BTI0	KIAA1632 protein	20,13	6,14	505	56,9	6,09
B1AL11	Leucine zipper putative tumor suppressor 2	10,61	6,03	199	20,7	9,51
Q6ZWB8	MAP6 protein	8,95	4,96	484	51,3	8,90
F5H689	Maternal embryonic leucine zipper kinase	17,31	6,72	610	70,1	9,04
Q9NR99	Matrix-remodeling-associated protein 5	6,86	1,98	2828	312,0	8,32
A0T3F4	Mucin 4	147,91	3,90	1437	151,9	6,80
Q8WXI7	Mucin-16	19,08	0,48	22152	2351,2	6,00
E7EPM4	Mucin-17	6,51	1,67	4262	425,3	4,03
G3CIG0	MUC19 variant 12	11,24	1,04	8384	804,8	5,01
B1AVQ5	Mucin 1, cell surface associated	3,26	6,53	475	49,2	6,90
E9PJC5	Mucin-6 (Fragment)	2,58	11,05	181	19,3	7,84
Q14324	Myosin-binding protein C, fast-type	12,13	1,67	1141	128,0	7,52
Q14214	Nebulin	13,44	1,09	2472	285,6	9,13
Q09666	Neuroblast differentiation-associated protein AHNAK	9,91	0,75	5890	628,7	6,15
P80188	Neutrophil gelatinase-associated lipocalin	4,76	16,67	198	22,6	8,91
A2A2V2	RNA-binding protein 34	22,47	3,68	408	45,9	10,08
Q96Q06	Perilipin-4	6,42	4,05	1357	134,3	8,73
C9JMW3	Poliovirus receptor-related protein 3	7,10	35,12	168	18,4	6,86
P01833	Polymeric-immunoglobulin receptor	11,02	3,80	764	83,2	5,74
Q4G0U5	Primary ciliary dyskinesia protein 1	6,93	4,88	840	96,8	8,62
P12273	Prolactin-inducible protein	5,19	10,96	146	16,6	8,05
Q9UPA5	Protein bassoon	5,17	1,07	3926	416,2	7,55
Q8N807	Protein disulfide-isomerase-like protein of the testis	7,39	3,60	584	66,6	6,86
Q9ULI3	Protein HEG homolog 1	6,53	4,27	1381	147,4	6,18
Q5T8A7	Protein phosphatase 1 regulatory subunit 26	4,55	2,40	1209	127,3	8,59
Q59H55	Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 13 isoform 2 variant	5,73	1,52	2434	271,3	6,52
A8MT19	Putative rhophilin-2-like protein	5,78	7,38	583	65,9	6,98
Q6WKZ4	Rab11 family-interacting protein 1	6,27	2,49	1283	137,1	5,47
F8W6W8	Regulating synaptic membrane exocytosis protein 2	38,91	3,27	1253	142,1	9,31
Q4VXB0	RING finger and CCCH-type zinc finger domain-containing protein 2	7,57	2,67	935	103,7	8,41
Q15413	Ryanodine receptor 3	24,93	0,49	4870	551,7	5,68
Q8IYB3	Serine/arginine repetitive matrix protein 1	22,13	2,99	904	102,3	11,84
Q9NQU5	Serine/threonine-protein kinase PAK 6	13,22	4,70	681	74,8	9,52
H7C1X5	SH3 and multiple ankyrin repeat domains protein 2	6,37	3,90	1128	121,1	5,62
A6NHU9	SH3 and multiple ankyrin repeat domains protein 2	4,77	1,46	1850	201,2	6,86
Q9P2P6	StAR-related lipid transfer protein 9	6,39	0,94	4700	516,0	6,32
E7ERH1	Tensin-1 (Fragment)	43,86	4,10	780	85,6	7,42

Q13647	Testis specific basic protein	6,08	8,63	568	63,3	9,48
D3DPG0	Titin, isoform CRA_a	27,04	0,34	34942	3878,8	6,38
F8WCH2	Transducin-like enhancer protein 2	6,88	8,36	706	75,3	6,24
Q7Z2Z1	Treslin	6,10	2,72	1910	210,7	8,78
Q86U96	TUBGCP2 protein	7,62	25,61	82	8,7	8,06
Q9UIG0	Tyrosine-protein kinase BAZ1B	6,51	1,62	1483	170,8	8,48
Q70CQ4	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 31	8,55	5,18	1352	146,6	9,22
F4MH91	Ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat protein Y-linked transcript variant 49	20,89	7,52	1264	139,6	7,91
E1U199	Ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat protein Y-linked transcript variant 56	25,88	6,68	1392	154,3	7,85
Q68DN1	Uncharacterized protein C2orf16	8,17	2,92	1984	224,2	10,08
Q8NAT4	cDNA FLJ34815 fis, clone NT2NE2007786	4,76	21,43	154	16,5	11,90
Q5T230	Undifferentiated embryonic cell transcription factor 1	5,33	13,20	341	36,4	10,90
Q15061	WD repeat-containing protein 43	5,93	7,09	677	74,8	5,57
P30291	Wee1-like protein kinase	5,64	6,19	646	71,6	6,77
A4UGR9	Xin actin-binding repeat-containing protein 2	64,17	1,22	3374	382,1	6,38
H0YC29	Zinc finger transcription factor Trps1 (Fragment)	5,13	6,20	694	76,2	6,07

Tabela 4. Proteínas presentes na PA formada *in situ* sobre a dentina no tempo de 2 horas.

Nº de Acesso	Nome da proteína	Score	Coverage	#AAs	PM [kDa]	pI
Q5Y190	Anchor protein	9,27	1,62	4186	453,0	6,83
Q5JPF3	Ankyrin repeat domain-containing protein 36C	6,24	2,36	1778	199,6	7,83
P04083	Annexin A1	10,75	10,12	346	38,7	7,02
B5BU38	Annexin	10,75	10,12	346	38,7	7,02
Q68DE3	Basic helix-loop-helix domain-containing protein KIAA2018	5,66	2,36	2245	241,5	7,61
Q5H9F3	BCL-6 corepressor-like protein 1	7,04	4,15	1711	182,4	7,24
Q562R1	Beta-actin-like protein 2	10,76	7,18	376	42,0	5,59
B3KVM6	cDNA FLJ16752 fis, clone BRACE2013010, highly similar to Homo sapiens human immunodeficiency virus type I enhancer binding protein 3 (HIVEP3), mRNA	5,09	7,14	630	66,5	6,64
B3KPT0	cDNA FLJ32143 fis, clone PLACE5000080, highly similar to Absent in melanoma 1 protein	5,89	3,56	926	98,6	7,59
B3KRD0	cDNA FLJ34045 fis, clone FCBBF2007095, highly similar to AT-hook-containing transcription factor 1	6,32	6,40	750	83,4	7,77
B3KUK3	cDNA FLJ40080 fis, clone TESTI2001795, highly similar to Homo sapiens regulator of G-protein signalling 22 (RGS22), Mrna	18,65	4,59	653	76,3	8,76
B4DJU9	cDNA FLJ55278, highly similar to AF4/FMR2 family member 1	5,45	3,89	849	91,6	9,42
B2RDG4	cDNA, FLJ96597	10,17	13,39	508	57,4	8,76
E5RH81	Carbonic anhydrase 1 (Fragment)	3,22	20,45	176	19,3	7,31
B0QXZ6	Chromobox homolog 6	5,05	7,11	394	41,9	9,99
Q8IWY9	Codanin-1	4,86	3,18	1227	134,0	6,77
D3DRA2	Collagen, type XVII, alpha 1, isoform CRA_b	8,07	2,00	1497	150,4	8,79
Q0VDD8	Dynein heavy chain 14, axonemal	14,44	1,71	3507	399,6	6,93
E7ESC6	Exportin-7	4,92	2,02	1088	124,0	6,48
Q5XX13	F-box/WD repeat-containing protein 10	11,12	3,80	1052	119,8	9,39
P20930	Filaggrin	9,93	2,49	4061	434,9	9,25
H6VRG2	Keratin 1	22,92	7,14	644	66,0	8,12
P13646	Keratin, type I cytoskeletal 13	46,40	9,61	458	49,6	4,96
P04264	Keratin, type II cytoskeletal 1	11,11	5,28	644	66,0	8,12
P02538	Keratin, type II cytoskeletal 6A	20,51	3,72	564	60,0	8,00
Q86Y46	Keratin, type II cytoskeletal 73	24,63	9,26	540	58,9	7,23
P22079	Lactoperoxidase	1,63	1,54	712	80,2	8,62
Q99558	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 14	6,92	2,85	947	104,0	7,72
A0T3F4	Mucin 4	65,12	3,90	1437	151,9	6,80
Q6W4X9	Mucin-6	5,22	0,78	2439	256,9	7,39
B5ME49	Mucin-16	21,35	1,27	14507	1518,2	5,26
Q86W25	NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 13	6,34	3,93	1043	118,8	5,66
E9PAV3	Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha	6,90	3,75	2078	205,3	9,58
E7ENN3	Nesprin-1	16,96	0,93	8409	966,0	5,55
E9PE34	PHD finger protein 3	7,87	3,81	813	90,9	6,99
A8MTF1	Phosphatidylinositol 4-kinase alpha	16,36	7,36	435	49,6	5,82
Q9H3B1	PRO1821	5,87	63,33	60	6,7	9,99
Q9UPA5	Protein bassoon	6,40	1,27	3926	416,2	7,55
Q8N807	Protein disulfide-isomerase-like protein of the testis	7,85	3,60	584	66,6	6,86

H7BZH1	Protein PRR14L	7,76	6,22	675	74,6	9,01
H7BXE0	Rho GTPase-activating protein 40	4,38	4,56	592	65,1	8,98
Q4VXB0	RING finger and CCCH-type zinc finger domain-containing protein 2	4,37	2,67	935	103,7	8,41
Q8N7X1	RNA-binding motif protein, X-linked-like-3	6,55	5,62	1067	114,9	9,10
Q15413	Ryanodine receptor 3	10,60	0,49	4870	551,7	5,68
Q8IYB3	Serine/arginine repetitive matrix protein 1	17,82	1,99	904	102,3	11,84
Q14515	SPARC-like protein 1	6,74	9,19	664	75,2	4,78
E7END2	Sperm-specific antigen 2	10,89	1,94	1084	119,1	5,34
A8MWI8	T-complex protein 1 subunit eta	7,67	1,77	339	37,5	6,46
D3DPG0	Titin, isoform CRA_a	22,39	0,26	34942	3878,8	6,38
H0YC87	Transmembrane protein 25	6,39	9,50	200	21,6	7,39
F4MH59	Ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat protein Y-linked transcript variant 8	6,35	6,29	1049	114,3	8,06
A4UGR9	Xin actin-binding repeat-containing protein 2	39,10	0,98	3374	382,1	6,38

A figura 12 mostra os diagramas de Venn com o número total de proteínas identificadas em cada substrato e tempo de formação da PA (esmalte 10 minutos e 2 horas; dentina 10 minutos e 2 horas). Para o esmalte, houve 16 proteínas comuns aos dois tempos de formação da película (Figura 12 A), enquanto que para a dentina houve 13 proteínas comuns aos dois tempos de formação a película (Figura 12 B). No trabalho de Lee et al (2013), na PA formada sobre o esmalte *in vivo* foram identificadas 66 proteínas comuns entre os tempos de formação da PA de 10 minutos e 2 horas.

Figura 12 - Diagrama de Venn mostrando o número de proteínas identificadas em cada grupo. **(A)** Proteínas da PA formada no esmalte após diferentes tempos (10 minutos e 2 horas). **(B)** Proteínas da PA formada na dentina após diferentes tempos (10 minutos e 2 horas).

No grupo do **esmalte** após 10 minutos da formação da PA, um total de 8 proteínas diferentes pertencentes ao grupo de queratinas foram identificadas *(cDNA FLJ55805, highly similar to Keratin type II cytoskeletal 4; cDNA FLJ78504 highly similar to Homo sapiens keratin 6A (KRT6A) mRNA; Keratin 1; Keratin 13; Keratin, type I cytoskeletal 13; Keratin, type I cytoskeletal 14; Keratin type II cytoskeletal 1; Keratin type II cytoskeletal 6A)*. Já quando a película foi coletada por 2 horas, foram identificadas apenas 3 tipos de queratinas *(cDNA FLJ78503, highly similar to Homo sapiens keratin 13 (KRT13) transcript variant 1 mRNA; Keratin 13; Keratin, type I cytoskeletal 13).* As queratinas são proteínas estruturais que estão presentes na PA por virem provavelmente da mucosa bucal, tendo sido detectadas na PA em vários trabalhos recentes (ZAIDAN, 2013; LEE et al., 2013; MASSON et al., 2013; ZIMMERMAN et al., 2013; SIQUEIRA et al., 2012; SIQUEIRA; CUSTODIO; MCDONALD, 2012; SIQUEIRA et al., 2010; SIQUEIRA ; OPPENHEIM, 2009; SIQUEIRA et al., 2007b).

Foram detectadas 130 e 39 proteínas da PA formada sobre o esmalte presente ***exclusivamente*** neste substrato, nos tempos de 10 minutos e 2 horas, respectivamente (Tabela 5). Dentre as proteínas exclusivas da PA formada no tempo de 10 minutos em esmalte, destacam-se algumas proteínas identificadas, como *Keratin 1, cDNA FLJ78504, highly similar to Homo sapiens keratin 6A (KRT6A), Collagen alpha-1(VII) chain, vários subtipos de mucinas, Proline-Rich Protein 18, statherin)*, que foram descritas na PA formada sobre o esmalte em diversos trabalhos (LEE, Y.H. 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., 2007b; ZIMMERMAN et al., 2013). As proteínas da família das mucinas foram previamente classificadas como proteínas que estão possivelmente envolvidas na formação de camada de proteínas pela interação direta com outras proteínas que são diretamente adsorvidas na superfície do esmalte, portanto consideradas como precursoras da formação da PA sobre o esmalte. Estas proteínas têm a importante função de lubrificação da cavidade bucal.

O mineral de esmalte é composto basicamente por hidroxiapatita, que são cristais formados por fosfato de cálcio. Neste sentido, a estaterina confere um papel de grande importância para a PA, pois tem potencial de interação direta com os íons de fosfato de cálcio do esmalte, sendo também considerada como proteína precursora da PA (ZIMMERMAN et al., 2013). Outra proteína identificada na PA formada sobre o esmalte, no tempo de 10 minutos, foi o *Collagen alpha-1(VII) chain*. Outra isoforma de colágeno foi também identificada na película formada sobre o esmalte em 2 horas, o *Collagen, type XVII, alpha 1, isoform CRA_b.*

Dentre as proteínas da PA consideradas como exclusivas formadas sobre o esmalte após o tempo de 2 horas, destacam-se entre este grupo algumas proteínas como: *cDNA FLJ53638, highly similar to Annexin A6, complement C3, Ig alpha-1 chain C region, lactoferrin e mucin-4 e 19.* As proteínas derivadas do sistema de complemento *(complement C3)* podem ser consideradas biomarcadores para doenças inflamatórias bucais, tais como a doença periodontal. A concentração dessa proteína na saliva e o fluido crevicular gengival pode aumentar ou diminuir de acordo com o nível de doença periodontal, sendo que, o nível de resposta inflamatória da doença periodontal está intimamente ligado com a composição da PA (SIQUEIRA et al., 2007b).

No presente trabalho, não foram identificadas proteínas da família das histatinas. Isto pode ser devido aos tempos de coleta (10 minutos e 2 horas). Um trabalho recente revelou que as histatinas sofrem uma grande redução na PA formada sobre o esmalte *in vivo* a partir de 10 minutos de sua formação, sendo que sua concentração praticamente se reduz pela metade de 5 a 10 minutos, permanencendo relativamente estável a partir de então, devido à degradação proteolítica (LEE, Y.H. et al., 2013).

Quando comparadas todas as proteínas da PA formada sobre **esmalte** nos diferentes tempos, 10 minutos e 2 horas, foram encontradas 16 proteínas comuns a ambos os tempos (10 minutos e 2 horas): *Cystatin-S, Keratin 13, Keratin, type I cytoskeletal 13, MUC19 variant 12, Mucin-16, Titin, isoform CRA_a , Xin actin-binding repeat-containing protein 2, Protein bassoon, Protein disulfide-isomerase-like protein of the testis, Ryanodine receptor 3, Serine/arginine repetitive matrix protein 1, Sperm-specific antigen 2, Statherin*, *Tensin-1, RNA-binding protein 34 e Myosin- ID).* A mucina 16 é uma proteína glicosilada que está envolvida principalmente na lubrificação das superfícies epiteliais luminais (RANCOURT et al., 2012). A *MUC19 variant 12* é secretada pelas glândulas salivares e traquéia. Os 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). Uma proteína não comumente descrita em PA que foi identificada neste trabalho nos grupos do esmalte é a *Titin.* Trata-se de uma proteína de alto peso molecular, com cerca de 1 µm de comprimento, composta principalmente de domínios similares a imunoglobulina e fibronectina e regiões ligadoras elásticas. Esta proteína combina diferentes funções: está envolvida na formação do sarcômero, é a principal fonte de elasticidade passiva do sarcômero e também está envolvida em transdução de sinal. Pela sua função no organismo aparentemente não apresenta uma função específica na PA, devendo estar presente nesta, uma vez que sua porção C-terminal é capaz de se ligar ao cálcio (GAUTEL, 2011). Pelo seu alto peso molecular, sua capacidade elástica e habilidade de se ligar ao cálcio, pode-se pensar que possa ter alguma função na proteção do esmalte contra desafios ácidos, o que deve ser testado em estudos futuros.

Tabela 5. Proteínas presentes exclusivamente na PA formada *in situ* sobre o esmalte.

	Nº de acesso	Descrição
Esmalte 10 minutos	Q712M9	5-hydroxytryptamine receptor 4
	H0YEJ5	7-dehydrocholesterol reductase
	Q8TE57	A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 16
	A7E242	A-kinase anchor protein 6
	H0YHB1	Arf-GAP with GTPase, ANK repeat and PH domain-containing protein 2
	H0YBF7	Arf-GAP with SH3 domain, ANK repeat and PH domain-containing protein 1
	Q09428	ATP-binding cassette sub-family C member 8
	Q562R1	Beta-actin-like protein 2
	Q8TDL5	BPI fold-containing family B member 1
	Q2F3K1	Calcium sensing receptor
	G3V4C0	Calmin
	Q9UBL0	cAMP-regulated phosphoprotein 21
	A7LI12	Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 16
	Q8N3K9	Cardiomyopathy-associated protein 5
	H0YDW7	CD44 antigen
	B3KS48	cDNA FLJ35471 fis, clone SMINT2006708, highly similar to Homo sapiens ubiquitin specific peptidase 31 (USP31)
	Q8N903	cDNA FLJ38624 fis, clone HEART2008994
	B3KVY2	cDNA FLJ41718 fis, clone HLUNG2013097, highly similar to SPLICING FACTOR, ARGININE/SERINE-RICH 2
	B4DMX2	cDNA FLJ51250, highly similar to Plasma kallikrein (EC 3.4.21.34)
	B7Z3F1	cDNA FLJ52429, weakly similar to LIM domain only protein 7
	B4DNT7	cDNA FLJ53070, highly similar to Macrosialin
	B4DS89	cDNA FLJ53091, highly similar to GDNF family receptor alpha-2
	B4E0F0	cDNA FLJ53428, highly similar to Disco-interacting protein 2 homolog A
	B4DWY9	cDNA FLJ53625, moderately similar to WD repeat and FYVE domain-containing protein 3
	B4DJU9	cDNA FLJ55278, highly similar to AF4/FMR2 family member 1
	B7Z3E7	cDNA FLJ56510, highly similar to Tumor suppressor p53-binding protein 1
	B4E0U5	cDNA FLJ56707, highly similar to Serine/threonine-protein kinase VRK3 (EC 2.7.11.1)
	B7Z759	cDNA FLJ61672, highly similar to Proteoglycan-4
	A8K5R2	cDNA FLJ77293, highly similar to Homo sapiens vasohibin 1 (VASH1), mRNA
	A8K8U1	cDNA FLJ77762, highly similar to Homo sapiens cullin-associated and neddylation-dissociated 1 (CAND1), mRNA
	A8K2I0	cDNA FLJ78504, highly similar to Homo sapiens keratin 6A (KRT6A), mRNA
	F5H2E2	CLIP-associating protein 1
	Q8IWY9	Codanin-1
	Q02388	Collagen alpha-1(VII) chain
	B3KQY9	DNA-directed RNA polymerase

B3KRQ8	DNA-directed RNA polymerase
Q63HN8	E3 ubiquitin-protein ligase RNF213
Q14511	Enhancer of filamentation 1
Q5XX13	F-box/WD repeat-containing protein 10
Q5CZC0	Fibrous sheath-interacting protein 2
F8W9W2	G protein-coupled receptor kinase 6
E7EV53	Gamma-aminobutyric acid receptor subunit alpha-6
E7EV50	Gamma-aminobutyric acid receptor subunit beta-2
C9J3Q2	Glutaminase liver isoform, mitochondrial
H0Y6I0	Golgin subfamily A member 4
Q86Y00	GTF2IRD2B protein
O14686	Histone-lysine N-methyltransferase 2D
P01591	Immunoglobulin J chain
D6RHJ6	Immunoglobulin J chain
Q9H1B7	Interferon regulatory factor 2-binding protein-like
H6VRG2	Keratin 1
A5YKK5	KIAA0232
Q5T7N2	LINE-1 type transposase domain-containing protein 1
Q13136	Liprin-alpha-1
B7Z2A6	Liprin-alpha-2
Q5TCQ9	Membrane-associated guanylate kinase, WW and PDZ domain-containing protein 3
F8WEW5	Membrane-associated phosphatidylinositol transfer protein 3
H7C066	Methyl-CpG-binding domain protein 5 (Fragment)
G3CIH4	MUC19 variant 17
G3CIH6	MUC19 variant 19
Q9Y3S4	MUC-B1 protein
P98088	Mucin-5AC
Q9HC84	Mucin-5B
Q6W4X9	Mucin-6
A8MX12	Myomesin-1
A6NIU4	Myomesin-3
E9PAV3	Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha
H0YA93	NEDD4-binding protein 2
B7Z9A6	N-sulphoglucosamine sulphohydrolase
Q6P4R8	Nuclear factor related to kappa-B-binding protein
C9JCR8	Nuclear receptor coactivator 3
Q05BP9	OLIG2 protein
Q8NDF8	PAP-associated domain-containing protein 5
Q9GZU2	Paternally-expressed gene 3 protein
Q8NEN9	PDZ domain-containing protein 8
G3V470	Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate 3-phosphatase and dual-specificity protein phosphatase PTEN
Q7Z443	Polycystic kidney disease protein 1-like 3
A5A3E0	POTE ankyrin domain family member F
Q32Q83	PPIL4 protein
Q9Y4D8	Probable E3 ubiquitin-protein ligase HECTD4
E9PL31	Proline-rich protein 18
Q9Y5I3	Protocadherin alpha-1
A2A3N6	Putative PIP5K1A and PSMD4-like protein

Q9C0F0	Putative Polycomb group protein ASXL3
Q5JV90	Putative uncharacterized protein DKFZp564P1772
Q63HQ7	Putative uncharacterized protein DKFZp686A1736
Q6MZW0	Putative uncharacterized protein DKFZp686J11235
E7EX08	Regulating synaptic membrane exocytosis protein 1
G3V112	Regulator of G-protein signaling 22
A0PJ83	REST protein
Q59HG6	Rho GTPase activating protein 6 isoform 1 variant
B4DR10	Rho-GTPase-activating protein 7
B3KX27	Rhophilin-2
B1APS8	Ribosomal protein S6 kinase delta-1
H0YGL9	Ryanodine receptor 2
Q6UWB4	Serine protease 55
Q96Q15	Serine/threonine-protein kinase SMG1
Q9H7U1	Serine-rich coiled-coil domain-containing protein 2
Q9Y6X0	SET-binding protein
E7ET49	Sn1-specific diacylglycerol lipase beta
Q5SXM2	snRNA-activating protein complex subunit 4
O94875	Sorbin and SH3 domain containing 2
Q7RTM4	Spectrin-like protein of the nuclear envelope and Golgi
Q76KD6	Speriolin
B3KUY1	Splicing factor, arginine/serine-rich 2, isoform CRA_d
Q7Z7G0	Target of Nesh-SH3
O60343	TBC1 domain family member 4
Q6PRX2	Transducin-like enhancer of split 3 splice variant 2
H0Y2M0	Transmembrane protein 131-like
Q9HCJ0	Trinucleotide repeat-containing gene 6C
Q9H2D6	TRIO and F-actin-binding protein
B4DIL8	Tuberin
Q6ZU65	Ubinuclein-2
D3DVA8	Ubiquilin 4, isoform CRA_a
B7WPF4	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase
F4MH43	Ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat protein Y-linked transcript variant 4
E1U1M3	Ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat protein Y-linked transcript variant 47
A6NGG8	Uncharacterized protein C2orf71
Q9UF83	Uncharacterized protein DKFZp434B061
Q8N7P7	Uncharacterized protein FLJ40521
Q9Y2F5	Uncharacterized protein KIAA0947
Q96PY0	Uncharacterized protein KIAA1908
Q5HYC2	Uncharacterized protein KIAA2026
O75445	Usherin
Q6IRT0	USP32 protein
B7Z6A0	UV radiation resistance-associated gene protein
Q9ULM3	YEATS domain-containing protein 2
P15822	Zinc finger protein 40
Q59FE0	Zinc finger protein 41 variant
O43149	Zinc finger ZZ-type and EF-hand domain-containing protein 1

	Nº de acesso	Descrição
Esmalte 2 horas	C9JLQ8	Adipocyte enhancer-binding protein 1
	Q8N4F0	BPI fold-containing family B member 2
	B7Z582	cDNA FLJ53638, highly similar to Annexin A6
	B4DTX1	cDNA FLJ53196, highly similar to SAM and SH3 domain-containing protein 1
	B7Z6W9	cDNA FLJ54555
	P00450	Ceruloplasmin
	Q14781	Chromobox protein homolog 2
	Q9BXJ5	Complement C1q tumor necrosis factor-related protein 2
	P01024	Complement C3
	B0I1S0	DYNC2H1 variant protein
	Q9P2D7	Dynein heavy chain 1, axonemal
	E9PHM6	Dystonin
	P22681	E3 ubiquitin-protein ligase CBL
	A2RUE7	Glutamate receptor, ionotropic, N-methyl-D-aspartate 3A
	E9PR05	Histone-lysine N-methyltransferase MLL
	Q96T68	Histone-lysine N-methyltransferase SETDB2
	P01876	Ig alpha-1 chain C region
	Q2XSU5	KIR3DL2 (Fragment)
	Q19KS2	Lactoferrin
	E9PGE3	LIM/homeobox protein Lhx8
	Q6NUQ9	Mitogen-activated protein kinase 8 interacting protein 1
	H0Y2Y1	Mucin-4 beta chain
	Q7Z5P9	Mucin-19
	Q8N6B4	Myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia/clathrin assembly protein fusion protein
	Q5T321	Neurobeachin
	Q9P242	Neuronal tyrosine-phosphorylated phosphoinositide-3-kinase adapter 2
	P16234	Platelet-derived growth factor receptor alpha
	Q659A9	Putative uncharacterized protein DKFZp547I0910
	Q6MZK8	Putative uncharacterized protein DKFZp686K06110
	Q6GYQ0	Ral GTPase-activating protein subunit alpha-1
	B4DJW3	Renalase
	E7EVZ3	Retinoic acid-induced protein 1
	C9J6S8	Serine/threonine-protein kinase 19
	Q8IYT8	Serine/threonine-protein kinase ULK2
	O75691	Small subunit processome component 20 homolog
	G3V220	Transcription elongation regulator 1, isoform CRA_c
	B2RBP0	Zinc finger and BTB domain containing 40, isoform CRA_a
	O60293	Zinc finger C3H1 domain-containing protein
	Q6AHZ1	Zinc finger protein 518A

Já em relação à dentina, foram identificadas 53 e 35 proteínas presentes ***exclusivamente*** nos tempos de 10 minutos e 2 horas, respectivamente (Tabela 6). Dentre as proteínas exclusivas para o tempo de 10 minutos, destacam-se as queratinas (*Keratin, type I cytoskeletal 13, Keratin, type I cytoskeletal 14, Keratin, type II cytoskeletal 1, Keratin, type II cytoskeletal 6A)*, que foram foram descritas por Zimmerman et al. (2013), no estudo em PA formada sobre o esmalte de dentes decíduos *in vivo*, sendo que estas proteínas fazem interação proteína/proteína e, na PA, têm função de regeneração de tecidos. A isoforma 1 e 6 da mucina também foi exclusiva da PA formada sobre a dentina por 10 minutos, assim como isoformas de imunoglobulinas (*Ig alpha-2 chain C region, Ig gamma-1 chain C region* e *Ig gamma-4 chain C region*).

Já para o tempo de formação da PA de 2 horas sobre a dentina, foram identificadas 35 proteínas presentes ***exclusivamente*** (Tabela 6). Dentre elas, destacam-se isoformas de queratinas, anidrase carbônica 1 e lactoperoxidase.

Quando feita a comparação de todas as proteínas da PA formada sobre dentina nos diferentes tempos (10 minutos e 2 horas), foram encontradas 13 proteínas comuns a ambos os tempos: *Annexin A1, anexin, Keratin, type I cytoskeletal 13, Keratin, type II cytoskeletal 1, Keratin, type II cytoskeletal 6A, Mucin 4, Protein bassoon, Protein disulfide-isomerase-like protein of the testis, RING finger and CCCH-type zinc finger domain-containing protein 2, Ryanodine receptor 3, Serine/arginine repetitive matrix protein 1, Titin, isoform CRA_a, Xin actin-binding repeat-containing protein 2.*

Tabela 6. Proteínas presentes exclusivamente na PA formada *in situ* sobre a dentina.

	Nº de acesso	Descrição
Dentina 10 minutos	H7C3S1	Actin-binding protein anillin
	Q6WG78	Antigen MLAA-14
	F8VZK3	Calcium/calmodulin-dependent 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase 1B
	Q8NAT4	cDNA FLJ34815 fis, clone NT2NE2007786
	B4DWU6	cDNA FLJ51361, highly similar to Keratin, type II cytoskeletal 6A
	B4DZC0	cDNA FLJ51771, highly similar to SWI/SNF-related matrix-associatedactin-dependent regulator of chromatin subfamily A member5
	B4DL23	cDNA FLJ53512, highly similar to Homo sapiens centrosomal protein 170 kDa (CEP170), transcript variant alpha, Mrna
	B4E187	cDNA FLJ60083, highly similar to Zinc finger protein 638 (Fragment)
	O14646	Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 1
	P48444	Coatomer subunit delta
	E9PPH6	Exophilin-5
	D3DX70	GRIP and coiled-coil domain containing 2, isoform CRA_a
	G5EA02	HCG21296, isoform CRA_c
	P01877	Ig alpha-2 chain C region
	P01857	Ig gamma-1 chain C region
	P01861	Ig gamma-4 chain C region
	Q93033	Immunoglobulin superfamily member 2
	Q59EZ3	Insulin-like growth factor 2 receptor variant
	Q9BTI0	KIAA1632 protein
	B1AL11	Leucine zipper putative tumor suppressor 2
	Q6ZWB8	MAP6 protein
	F5H689	Maternal embryonic leucine zipper kinase
	B1AVQ5	Mucin 1, cell surface associated
	E9PJC5	Mucin-6 (Fragment)
	Q14324	Myosin-binding protein C, fast-type
	Q14214	Nebulin
	Q09666	Neuroblast differentiation-associated protein AHNAK
	P80188	Neutrophil gelatinase-associated lipocalin
	C9JMW3	Poliovirus receptor-related protein 3
	P01833	Polymeric-immunoglobulin receptor
	Q4G0U5	Primary ciliary dyskinesia protein 1
	Q5T8A7	Protein phosphatase 1 regulatory subunit 26
	H7C2P2	Protein sidekick-2
	Q59H55	Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 13 isoform 2 variant
	A8MT19	Putative rhophilin-2-like protein
	Q6WKZ4	Rab11 family-interacting protein 1

	F8W6W8	Regulating synaptic membrane exocytosis protein 2
	H7C1X5	SH3 and multiple ankyrin repeat domains protein 2
	A6NHU9	SH3 and multiple ankyrin repeat domains protein 2
	Q9P2P6	StAR-related lipid transfer protein 9
	Q13647	Testis specific basic protein
	F8WCH2	Transducin-like enhancer protein 2
	Q7Z2Z1	Treslin
	Q86U96	TUBGCP2 protein
	Q9UIG0	Tyrosine-protein kinase BAZ1B
	Q70CQ4	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 31
	F4MH91	Ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat protein Y-linked transcript variant 49
	E1U199	Ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat protein Y-linked transcript variant 56
	Q68DN1	Uncharacterized protein C2orf16
	Q5T230	Undifferentiated embryonic cell transcription factor 1
	Q15061	WD repeat-containing protein 43
	P30291	Wee1-like protein kinase
	H0YC29	Zinc finger transcription factor Trps1

	Nº de acesso	**Descrição**
Dentina 2 horas	Q5JPF3	Ankyrin repeat domain-containing protein 36C
	Q68DE3	Basic helix-loop-helix domain-containing protein KIAA2018
	Q5H9F3	BCL-6 corepressor-like protein 1
	Q562R1	Beta-actin-like protein 2
	E5RH81	Carbonic anhydrase 1
	B3KVM6	cDNA FLJ16752 fis, clone BRACE2013010, highly similar to Homo sapiens human immunodeficiency virus type I enhancer binding protein 3 (HIVEP3), mRNA
	B3KPT0	cDNA FLJ32143 fis, clone PLACE5000080, highly similar to Absent in melanoma 1 protein
	B3KRD0	cDNA FLJ34045 fis, clone FCBBF2007095, highly similar to AT-hook-containing transcription factor 1
	B3KUK3	cDNA FLJ40080 fis, clone TESTI2001795, highly similar to Homo sapiens regulator of G-protein signalling 22 (RGS22), Mrna
	B4DJU9	cDNA FLJ55278, highly similar to AF4/FMR2 family member 1
	B2RDG4	cDNA, FLJ96597
	B0QXZ6	Chromobox homolog 6
	Q8IWY9	Codanin-1
	Q0VDD8	Dynein heavy chain 14, axonemal
	E7ESC6	Exportin-7
	Q5XX13	F-box/WD repeat-containing protein 10
	P20930	Filaggrin
	H6VRG2	Keratin 1
	Q86Y46	Keratin, type II cytoskeletal 73
	P22079	Lactoperoxidase

Q99558	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 14
Q6W4X9	Mucin-6
Q86W25	NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 13
E9PAV3	Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha
E7ENN3	Nesprin-1
E9PE34	PHD finger protein 3
A8MTF1	Phosphatidylinositol 4-kinase alpha
Q9H3B1	PRO1821
H7BZH1	Protein PRR14L
H7BXE0	Rho GTPase-activating protein 40
Q8N7X1	RNA-binding motif protein, X-linked-like-3
Q14515	SPARC-like protein 1
A8MWI8	T-complex protein 1 subunit eta
H0YC87	Transmembrane protein 25
F4MH59	Ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat protein Y-linked transcript variant 8

O principal objetivo deste trabalho foi detectar alterações no perfil proteico das PAs formadas sobre esmalte e dentina. A Figura 13 (A e B) mostra os diagramas de Venn com o número total de proteínas identificadas nestes substratos para cada tempo de coleta da PA (10 minutos e 2 horas).

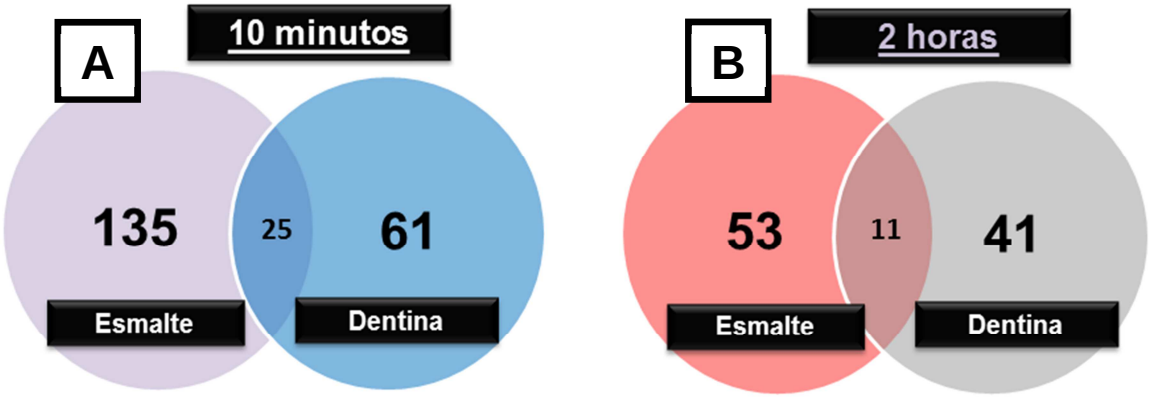


Figura 13 - Diagrama de Venn mostrando o número de proteínas identificadas em cada grupo. **(A)** Proteínas da PA formada após 10 minutos sobre o esmalte e dentina. **(B)** Proteínas da PA formada após 2 horas sobre esmalte e dentina.

Na PA formada em 10 minutos, foram encontradas 25 proteínas comuns a ambos os substratos, a saber: *Actin, cytoplasmic 1; Annexin; Annexin A1; Carbonic anhydrase 6; Cystatin-S; cDNA FLJ55805, highly similar to Keratin, type II cytoskeletal 4; Hyaluronan and proteoglycan link protein 1; Keratin, type I cytoskeletal 13; Keratin, type I cytoskeletal 14; Keratin, type II cytoskeletal 1; Keratin, type II cytoskeletal 6A; MUC19 variant 12; Mucin 4; Mucin 16; Perilipin-4; Prolactin-*

inducible protein; Protein bassoon; Protein disulfide-isomerase-like protein of the testis; Protein HEG homolog 1; RNA-binding protein 34; Ryanodine receptor 3; Serine/arginine repetitive matrix protein 1; Tensin-1 (Fragment); Titin, isoform CRA_a; Xin actin-binding repeat-containing protein 2. Estas proteínas comuns entre os substratos tiveram sua diferença de expressão quantificada utilizando a ferramenta SIEVE. A abundância relativa de uma proteína individual a partir do esmalte foi considerada significativamente diferente da dentina quando os valores observados foram inferiores a 0,75 para diminuição e superiores a 1,25 para aumento de abundância, além de o valor de p ser 0,05, o que resultou em 17 proteínas com expressão diferencial (Tabela 7).

Tabela 7 – Quantificação (SIEVE) das proteínas presentes na PA formada sobre o esmalte (E) e dentina (D) em 10 minutos

Número de acesso	Descrição	Ratio D/E	p
A0T3F4	Mucin 4 (Fragment)	2,20	0,001
A2A2V2	RNA-binding protein 34	1,56	0,001
A4UGR9	Xin actin-binding repeat-containing protein 2	2,36	0,005
B4DRW1	cDNA FLJ55805, highly similar to Keratin, type II cytoskeletal 4	2,11	0,001
P02533	Keratin, type I cytoskeletal 14	0,52	0,002
P02538	Keratin, type II cytoskeletal 6A	1,66	0,001
P04083	Annexin A1	1,86	0,001
P12273	Prolactin-inducible protein	1,96	0,002
P13646	Keratin, type I cytoskeletal 13	0,33	0,003
P60709	Actin, cytoplasmic 1	0,69	0,003
Q14324	Myosin-binding protein C, fast-type	2,30	0,002
Q15413	Ryanodine receptor 3	1,65	0,011
Q8N807	Protein disulfide-isomerase-like protein of the testis	0,63	0,001
Q8WXI7	Mucin-16	0,33	0,002
Q96Q06	Perilipin-4	1,50	0,000
Q9UBL0	cAMP-regulated phosphoprotein 21	1,32	0,000
Q9UPA5	Protein bassoon	0,59	0,000

Dentre as proteínas classicamente descritas na PA formada sobre o esmalte, foram identificadas em ambos os substratos apenas as anexinas, anidrase carbônica, queratinas, e mucinas (LEE, Y.H. et al., 2013; SIQUEIRA; OPPENHEIM, 2009; SIQUEIRA et al., 2007b; ZIMMERMAN et al., 2013). Dentre elas, as anexinas estão envolvidas com o processo de remineralização e têm uma alta afinidade com a superfície do esmalte, tendo a função de manter a integridade dos tecidos dentários.

(SIQUEIRA et al., 2007b). Em adição, a *Annexin A1* é um mediador anti-inflamatório, de uma família de proteínas ligantes de fosfolipídeos dependentes do cálcio e atua como um potente moduladores endógeno da inflamação, inibindo a atividade de enzimas que atuam na produção de mediadores pró-inflamatórios e interferindo no processo de transmigração dos leucócitos (OLIANI; GIL, 2006). No presente estudo, a anexina teve sua expressão aumentada na PA formada sobre a dentina, quando comparada ao esmalte. Outra proteína comum a ambos os substratos no tempo de 10 minutos foi a anidrase carbônica 6, enzima responsável pela capacidade tampão, estando envolvida com a neutralização de ácidos. Atua na saliva e sobre as superfícies dentárias neutralizando os ácidos resultantes da ação dos microrganismos sobre os carboidratos (HANNIG, M.; JOINER, 2006). Entretanto, a diferença de expressão da anidrase carbônica não foi significativa quando o esmalte foi comparado com a dentina. A cistatina-S, relacionada com a defesa, por estar envolvida na modulação do sistema imune e nas atividades antivirais e antibactericida, também foi comum a ambos os substratos, mas a diferença de expressão não foi significativa. Esta proteína é inibidores de cisteína-proteases (CPs), atuando intra e extracelularmente. As cistatinas podem ser usadas como biomarcadores para a detecção de doenças locais e sistêmicas relacionadas à cavidade bucal, e outros processos patológicos (SCARANO et al., 2010). Foram identificadas ainda nas PAs formada sobre os 2 substratos no tempo de 10 minutos várias isoformas de mucinas. A quantificação pelo SIEVE revelou que a *Mucin 4* estava aumentada na dentina quando comparada ao esmalte, enquanto que a *Mucin 16* estava diminuída, sugerindo uma compensação. O mesmo foi observado em relação às queratinas, sendo que as *cDNA FLJ55805, highly similar to Keratin, type II cytoskeletal 4* e *Keratin, type II cytoskeletal 6A* estavam aumentadas na dentina comparada ao esmalte, enquanto que a *Keratin, type I cytoskeletal 14* e *Keratin, type I cytoskeletal 13* estavam diminuídas. Na Tabela 7, chama a atenção a superexpressão da *Xin actin-binding repeat-containing protein 2*, também conhecida como *Beta-xin* ou *Cardiomyopathy-associated protein 3,* na PA formada sobre a dentina. Esta proteína está relacionada com a proteção dos filamentos de actina da despolimerização (UNIPROT), e nunca tinha sido descrita anteriormente na PA, na qual sua função ainda é desconhecida. Outra proteína superexpressa na PA de dentina, também com função estrutural mas ainda não descrita na PA, e relacionada à actina é a *Myosin-binding protein C, fast-type.* É uma proteína associada a

filamentos espessos localizada na região cruzada das bandas a do músculo estriado de vertebrados. Liga-se, *in vitro*, à actina filamentosa e a filamentos nativos finos, além de modificar a atividade da ATPase de miosina ativada por actina, podendo modular a contração muscular (UNIPROT).

No tempo de 10 minutos de formação da PA, 135 e 61 proteínas foram exclusivas ao esmalte ou à dentina, respectivamente (Figura 13 A; Tabela 8). Dentre as proteínas exclusivas da dentina, muitas delas nunca foram anteriormente descritas na PA, como *a Matrix-remodelling-associated protein 5*, que é conhecida também por *Adlican*, sendo constituída por motivos repetidos ricos em leucina, além de conter domínios de imunoglobulina relacionados a *Perlecan,* que é uma proteoglicana da matriz extracelular com papel crucial no desenvolvimento de tecidos e organogênese, desde o estabelecimento da cartilagem até a regulação da cicatrização, com mecanismo de ação baseado em interações com fatores de crescimento, morfogênese e proteínas da matriz. O ambiente extracelular local determina a função do *Perlecan* (KNOX; WHITELOCK, 2006). Entretanto, seu papel quando presente na PA ainda não é conhecido.

Na PA adquirida formada sobre a dentina em 10 minutos, foram identificadas várias proteínas relacionadas ao complexo Cálcio/calmodulina, que pode modular muitos processos intracelulares fisiológicos e metabólicos, tendo um papel crucial na sinalização celular. Proteínas extracelulares que se ligam à calmodulina foram identificadas em fluidos corporais de animais, incluindo a saliva, tendo sido sugerido que as mesmas estão envolvidas em diferentes funções fisiológicas da calmodulina extracelular, provavelmente relacionadas com a função de primeiro mensageiro do cálcio extracelular (WENQIANG et al., 1997). Muitas das proteínas às quais a calmodulina se liga são incapazes de se ligarem por si mesmas ao cálcio, e desta forma usam a calmodulina como um sensor de cálcio e transdutor de sinal (YOSHIOKA et al., 2012). Três proteínas relacionadas à calmodulina foram identificadas no presente estudo: *Calcium/calmodulin-dependent 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase 1B, Calmodulin regulated spectrin-associated protein 1 (CAMSAP1)* e *Microtubule-associated protein 6* (*MAP6*). Apesar de as proteínas que se ligam à calmodulina terem sido identificadas em diferentes fluidos biológicos, incluindo a saliva, sua função na PA ainda não é conhecida e merece ser melhor estudada.

Também chamaram a atenção, dentro das proteínas identificadas na PA formada sobre a dentina em 10 minutos, proteínas associadas à tumorigênese, como a *KIAA1632 protein, Leucine zipper putative tumor suppressor 2 (LZTS2), Protein phosphatase 1 regulatory subunit 26 (KIAA0649)* e *Serine/threonine-protein kinase PAK 6*. A *KIAA1632 protein* tem sido utilizada como marcador de câncer de mama (HALAMA et al., 2007), enquanto que a expressão de *LZTS2* está relacionada ao câncer de próstata (JOHNSON et al., 2012). Já a *KIAA0649* tem características oncogênicas, aumentando a formação de colônias e permitindo o crescimento ancoragem-independente (YANG et al., 2005). A *Serine/threonine-protein kinase PAK 6* está envolvida em inúmeros processos celulares incluindo o rearranjo do citoesqueleto, a apoptose e a via de sinalização das quinases ativadas por mitógenos (MAPK). Esta proteína interage com receptor de andrógenos e se transloca para o núcleo, onde está envolvida na regulação da transcrição. Alterações na expressão do gene desta proteína têm sido associadas ao câncer de próstata (LIU et al., 2012). Estes achados indicam que a PA formada sobre a dentina tenha um potencial melhor para a detecção de biomarcadores de neoplasias que a PA formada sobre o esmalte.

Também foram identificadas na PA formada sobre a dentina em 10 minutos algumas proteínas relacionadas à fosforilação/desfosforilação de proteínas, como a *Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 13 isoform 2 variant* e *Tyrosine-protein kinase BAZ1B*. A *Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 13 isoform 2 variant* pertence à família das tirosina fosfatases (PTPs). A fosforilação em tirosina é um importante mecanismo de sinalização em células eucarióticas. Em casos de câncer, a ativação oncogênica de tirosina quinases é uma característica comum, e novas drogas anticâncer têm sido introduzidas tendo estas enzimas como alvo. A fosforilação em tirosina também é controlada pelas PTPs, que podem funcionar como supressores de tumor, embora algumas PTPs sejam capazes de regular positivamente a sinalização de receptores de fatores de crescimento, funcionando como oncogênicos (OSTMAN; HELLBERG; BOHMER, 2006). Já a *Tyrosine-protein kinase BAZ1B* codifica um membro da família de proteínas *bromodomain*, envolvidas na regulação da cromatina dependente da transcrição (UNIPROT).

Em relação à PA formada sobre o esmalte, no tempo de 10 minutos, várias proteínas estavam presentes apenas neste substrato (Tabela 8). Dentre elas, destacam-se algumas que nunca foram citadas em trabalhos prévios envolvendo

proteômica de PA de esmalte (ZAIDAN, 2013; LEE et al., 2013; ZIMMERMAN et al., 2013; SIQUEIRA et al., 2010; SIQUEIRA ; OPPENHEIM, 2009; SIQUEIRA et al., 2007b), como: *A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 16 (ADMTS-16); Calcium sensing receptor (CASR); Calmin (Rainb12); cAMP-regulated phosphoprotein 21 (ARPP 21); CD44 antigen (CD44); CLIP-associating protein 1 (CLASP1); GTF2IRD2B protein; Proline-rich protein 18 (Fragment) e Regulating synaptic membrane exocytosis protein 1 (RIMS1)*.

A *ADMTS-16* pertence a uma família de proteases da matriz dependentes de zinco, e é altamente expressa no pulmão fetal, rins, cérebro adulto e ovário (CAL et al., 2002) cujos substratos ainda são desconhecidos, parece ter atividade de *aggrecanase* (ZENG et al., 2006) ou clivar a α-2 macroglubulina (GAO et al., 2007). O receptor sensível ao cálcio (CASR) é acoplado à proteína G, e tem importância na manutenção da homeostase do cálcio. Esse receptor encontra-se expresso em tecidos diretamente relacionados à homeostase do cálcio extracelular (paratiróides, células parafoliculares tiroidianas, rins, intestino e ossos) e em tecidos sem aparente relação com a manutenção dessa homeostase (cérebro, pulmões e pâncreas) (GUARNIERI et al., 2012). A *Calmin,* cuja função é desconhecida, está altamente distribuída em linhagem de células cancerígenas (MARZINKE et al., 2009). A *ARPP 21* está superexpressa no ligamento periodontal de dentes adultos, quando comparado ao de dentes decíduos, estando relacionada a respostas neurológicas, regulando os efeitos da dopamina (SONG et al., 2013).

A *CD44* é uma família de glicoproteínas de membrana celular integral, com várias funções, como interações célula/matriz, agregação celular, sinalização e angiogênese. Atua como co-estimulante molecular na indução de funções efetoras em células-T. É normalmemte expressa em tecidos epiteliais, mesoteliais e hematopoiéticos (GHALY et al., 2005). As CLASPs são de uma família associada aos microtúbulos, filamentos polares fundamentais para estabelecer o plano de divisão celular correto. C*LASP1* é fator essencial para manter a posição do fuso e do eixo de divisão celular correta em células humanas. Tem grande importância biológica, pois o posicionamento do fuso é essencial durante a embriogênese e homeostase de células-troncos (MIMORI-KIYOSUE et al., 2005; SAMORA et al., 2011). A proteína *GTF2IRD2B* pertence à família dos fatores de transcrição gerais, com capacidade de se ligar ao DNA (GUNBIN; RUVINSKY, 2012). A proteína *RIMS1* está envolvida com o processo de regulação de exocitose na vesícula sináptica.

Também desempenha um papel na regulação de canais de cálcio-dependentes durante a liberação de insulina e neurotransmissores. A regulação de canais de cálcio voltagem-dependente pré-sinápticos é fundamental para induzir a despolarização de- liberação de neurotransmissores (HIBINO et al., 2002; WEISS et al., 2011).

Apesar de a função destas proteínas em diferentes tecidos estar elucidada, estudos são necessários para se determinar qual o seu papel na PA. Ainda foi identificada uma proteína da família das PRPs, a *Proline-rich protein 18.* Várias outras isoformas desta proteína já foram descritas na película, sendo reconhecidas como "precursoras da formação da PA", pela sua grande afinidade com o esmalte dentário, decorrente de suas interações eletrostáticas (HANNIG, M.; JOINER, 2006). Entretanto, a isoforma 18 nunca tinha sido descrita na PA anteriormente.

Tabela 8 - Proteínas presentes exclusivamente na PA formada *in situ* sobre o esmalte e dentina por 10 minutos.

	Nº de acesso	Descrição
Esmalte 10 minutos	Q712M9	5-hydroxytryptamine receptor 4
	H0YEJ5	7-dehydrocholesterol reductase
	Q8TE57	A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 16
	A7E242	A-kinase anchor protein 6
	H0YHB1	Arf-GAP with GTPase, ANK repeat and PH domain-containing protein 2
	H0YBF7	Arf-GAP with SH3 domain, ANK repeat and PH domain-containing protein 1
	Q09428	ATP-binding cassette sub-family C member 8
	Q562R1	Beta-actin-like protein 2
	Q2F3K1	Calcium sensing receptor
	G3V4C0	Calmin
	Q9UBL0	cAMP-regulated phosphoprotein 21
	A7LI12	Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 16
	Q8N3K9	Cardiomyopathy-associated protein 5
	H0YDW7	CD44 antigen
	O94875	Sorbin and SH3 domain containing 2
	B3KS48	cDNA FLJ35471 fis, clone SMINT2006708, highly similar to Homo sapiens ubiquitin specific peptidase 31 (USP31)
	Q8N903	cDNA FLJ38624 fis, clone HEART2008994
	B3KVY2	cDNA FLJ41718 fis, clone HLUNG2013097, highly similar to SPLICING FACTOR, ARGININE/SERINE-RICH 2
	B4DMX2	cDNA FLJ51250, highly similar to Plasma kallikrein (EC 3,4,21,34)
	B7Z3F1	cDNA FLJ52429, weakly similar to LIM domain only protein 7

B4DNT7	cDNA FLJ53070, highly similar to Macrosialin
B4DS89	cDNA FLJ53091, highly similar to GDNF family receptor alpha-2
B4E0F0	cDNA FLJ53428, highly similar to Disco-interacting protein 2 homolog A
B4DJU9	cDNA FLJ55278, highly similar to AF4/FMR2 family member 1
B7Z3E7	cDNA FLJ56510, highly similar to Tumor suppressor p53-binding protein 1
B4E0U5	cDNA FLJ56707, highly similar to Serine/threonine-protein kinase VRK3 (EC 2,7,11,1) OS=Homo sapiens PE=2 SV=1 - [B4E0U5_HUMAN]
B7Z2A6	Liprin-alpha-2
B4DR10	Rho-GTPase-activating protein 7
B7Z759	cDNA FLJ61672, highly similar to Proteoglycan-4
Q14511	Enhancer of filamentation 1
A8K5R2	cDNA FLJ77293, highly similar to Homo sapiens vasohibin 1 (VASH1), mRNA
A8K8U1	cDNA FLJ77762, highly similar to Homo sapiens cullin-associated and neddylation-dissociated 1 (CAND1), mRNA
A8K2I0	cDNA FLJ78504, highly similar to Homo sapiens keratin 6A (KRT6A), mRNA
F5H2E2	CLIP-associating protein 1
Q8IWY9	Codanin-1
Q02388	Collagen alpha-1(VII) chain
B3KQY9	DNA-directed RNA polymerase
B3KRQ8	DNA-directed RNA polymerase
Q63HN8	E3 ubiquitin-protein ligase RNF213
Q5XX13	F-box/WD repeat-containing protein 10
Q5CZC0	Fibrous sheath-interacting protein 2
F8W9W2	G protein-coupled receptor kinase 6
E7EV53	Gamma-aminobutyric acid receptor subunit alpha-6
E7EV50	Gamma-aminobutyric acid receptor subunit beta-2
C9J3Q2	Glutaminase liver isoform, mitochondrial
H0Y6I0	Golgin subfamily A member 4
Q86Y00	GTF2IRD2B protein
O14686	Histone-lysine N-methyltransferase 2D
P01591	Immunoglobulin J chain
D6RHJ6	Immunoglobulin J chain
Q9H1B7	Interferon regulatory factor 2-binding protein-like
H6VRG2	Keratin 1
A1A4E9	Keratin 13
A5YKK5	KIAA0232
Q5T7N2	LINE-1 type transposase domain-containing protein 1
Q13136	Liprin-alpha-1
Q8TDL5	BPI fold-containing family B member 1
Q5TCQ9	Membrane-associated guanylate kinase, WW and PDZ domain-containing protein 3
F8WEW5	Membrane-associated phosphatidylinositol transfer protein 3
H7C066	Methyl-CpG-binding domain protein 5 (Fragment)

B5ME49	Mucin-16
Q9HC84	Mucin-5B
Q6W4X9	Mucin-6
G3CIH4	MUC19 variant 17 (Fragment)
G3CIH6	MUC19 variant 19 (Fragment)
Q9Y3S4	MUC-B1 protein (Fragment)
P98088	Mucin-5AC (Fragments)
A8MX12	Myomesin-1
A6NIU4	Myomesin-3
Q92827	Myosin-ID
E9PAV3	Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha
H0YA93	NEDD4-binding protein 2
B7Z9A6	N-sulphoglucosamine sulphohydrolase
Q6P4R8	Nuclear factor related to kappa-B-binding protein
C9JCR8	Nuclear receptor coactivator 3
Q05BP9	OLIG2 protein
Q8NDF8	PAP-associated domain-containing protein 5
Q9GZU2	Paternally-expressed gene 3 protein
Q8NEN9	PDZ domain-containing protein 8
Q7Z443	Polycystic kidney disease protein 1-like 3
A5A3E0	POTE ankyrin domain family member F
Q32Q83	PPIL4 protein
Q9Y4D8	Probable E3 ubiquitin-protein ligase HECTD4
Q9H7U1	Serine-rich coiled-coil domain-containing protein 2
Q9Y5I3	Protocadherin alpha-1
A2A3N6	Putative PIP5K1A and PSMD4-like protein
Q9C0F0	Putative Polycomb group protein ASXL3
Q5JV90	Putative uncharacterized protein DKFZp564P1772
Q63HQ7	Putative uncharacterized protein DKFZp686A1736
Q6MZW0	Putative uncharacterized protein DKFZp686J11235
E9PL31	Proline-rich protein 18 (Fragment)
E7EX08	Regulating synaptic membrane exocytosis protein 1
G3V112	Regulator of G-protein signaling 22
A0PJ83	REST protein
Q59HG6	Rho GTPase activating protein 6 isoform 1 variant
B3KX27	Rhophilin-2
B1APS8	Ribosomal protein S6 kinase delta-1
H0YGL9	Ryanodine receptor 2
Q6UWB4	Serine protease 55
Q96Q15	Serine/threonine-protein kinase SMG1
Q9Y6X0	SET-binding protein
E7ET49	Sn1-specific diacylglycerol lipase beta
Q5SXM2	snRNA-activating protein complex subunit 4
Q7RTM4	Spectrin-like protein of the nuclear envelope and Golgi
Q76KD6	Speriolin

	E7END2	Sperm-specific antigen 2
	B3KUY1	Splicing factor, arginine/serine-rich 2, isoform CRA_d
	P02808	Statherin
	Q7Z7G0	Target of Nesh-SH3
	O60343	TBC1 domain family member 4
	G3V470	Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate 3-phosphatase and dual-specificity protein phosphatase PTEN
	Q6PRX2	Transducin-like enhancer of split 3 splice variant 2
	H0Y2M0	Transmembrane protein 131-like
	Q9HCJ0	Trinucleotide repeat-containing gene 6C
	Q9H2D6	TRIO and F-actin-binding protein
	B4DIL8	Tuberin
	Q6ZU65	Ubinuclein-2
	D3DVA8	Ubiquilin 4, isoform CRA_a
	B7WPF4	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase
	F4MH43	Ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat protein Y-linked transcript variant 4
	E1U1M3	Ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat protein Y-linked transcript variant 47
	A6NGG8	Uncharacterized protein C2orf71
	Q9UF83	Uncharacterized protein DKFZp434B061
	Q8N7P7	Uncharacterized protein FLJ40521
	Q9Y2F5	Uncharacterized protein KIAA0947
	Q96PY0	Uncharacterized protein KIAA1908
	Q5HYC2	Uncharacterized protein KIAA2026
	O75445	Usherin
	Q6IRT0	USP32 protein
	B7Z6A0	UV radiation resistance-associated gene protein
	B4DWY9	cDNA FLJ53625, moderately similar to WD repeat and FYVE domain-containing protein 3
	Q9ULM3	YEATS domain-containing protein 2
	P15822	Zinc finger protein 40
	Q59FE0	Zinc finger protein 41 variant
	O43149	Zinc finger ZZ-type and EF-hand domain-containing protein 1

	Nº de acesso	**Descrição**
Dentina 10 minutos	H7C3S1	Actin-binding protein anillin
	Q6WG78	Antigen MLAA-14
	F8VZK3	Calcium/calmodulin-dependent 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase 1B
	B7ZLW1	CAMSAP1 protein
	Q8NAT4	cDNA FLJ34815 fis, clone NT2NE2007786
	B4DWU6	cDNA FLJ51361, highly similar to Keratin, type II cytoskeletal 6A
	B4DZC0	cDNA FLJ51771, highly similar to SWI/SNF-related matrix-associatedactin-dependent regulator of chromatin subfamily A member5
	B4DL23	cDNA FLJ53512, highly similar to Homo sapiens centrosomal protein 170 kDa (CEP170), transcript variant alpha, mRNA
	B4E187	cDNA FLJ60083, highly similar to Zinc finger protein 638

	(Fragment)
A8K2H9	cDNA FLJ78503, highly similar to Homo sapiens keratin 13 (KRT13), transcript variant 1, mRNA
O14646	Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 1
P48444	Coatomer subunit delta
P01024	Complement C3
E9PPH6	Exophilin-5
D3DX70	GRIP and coiled-coil domain containing 2, isoform CRA_a
G5EA02	HCG21296, isoform CRA_c
Q9NR48	Histone-lysine N-methyltransferase ASH1L
P01877	Ig alpha-2 chain C region
P01857	Ig gamma-1 chain C region
P01861	Ig gamma-4 chain C region
Q93033	Immunoglobulin superfamily member 2
Q59EZ3	Insulin-like growth factor 2 receptor variant
Q9BTI0	KIAA1632 protein
B1AL11	Leucine zipper putative tumor suppressor 2
Q6ZWB8	MAP6 protein
F5H689	Maternal embryonic leucine zipper kinase
Q9NR99	Matrix-remodeling-associated protein 5
B1AVQ5	Mucin 1, cell surface associated
E9PJC5	Mucin-6 (Fragment)
E7EPM4	Mucin-17
Q14324	Myosin-binding protein C, fast-type
Q14214	Nebulin
Q09666	Neuroblast differentiation-associated protein AHNAK
P80188	Neutrophil gelatinase-associated lipocalin
C9JMW3	Poliovirus receptor-related protein 3
P01833	Polymeric-immunoglobulin receptor
Q4G0U5	Primary ciliary dyskinesia protein 1
Q5T8A7	Protein phosphatase 1 regulatory subunit 26
H7C2P2	Protein sidekick-2
Q59H55	Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 13 isoform 2 variant
A8MT19	Putative rhophilin-2-like protein
Q6WKZ4	Rab11 family-interacting protein 1
F8W6W8	Regulating synaptic membrane exocytosis protein 2
Q4VXB0	RING finger and CCCH-type zinc finger domain-containing protein 2
Q9NQU5	Serine/threonine-protein kinase PAK 6
H7C1X5	SH3 and multiple ankyrin repeat domains protein 2
A6NHU9	SH3 and multiple ankyrin repeat domains protein 2
Q9P2P6	StAR-related lipid transfer protein 9
Q13647	Testis specific basic protein
F8WCH2	Transducin-like enhancer protein 2
Q7Z2Z1	Treslin
Q86U96	TUBGCP2 protein

Q9UIG0	Tyrosine-protein kinase BAZ1B
Q70CQ4	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 31
F4MH91	Ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat protein Y-linked transcript variant 49
E1U199	Ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat protein Y-linked transcript variant 56
Q68DN1	Uncharacterized protein C2orf16
Q5T230	Undifferentiated embryonic cell transcription factor 1
Q15061	WD repeat-containing protein 43
P30291	Wee1-like protein kinase
H0YC29	Zinc finger transcription factor Trps1

Quando se avaliaram as proteínas da PA formada após o período de 2 horas sobre esmalte e dentina, estavem presentes 53 e 41 proteínas exclusivas em cada substrato, respectivamente (Figura 13 B; Tabela 10), além de 11 proteínas comuns a ambos os substratos.

As 11 proteínas comuns a ambos os substratos foram: *Anchor protein; Collagen, type XVII, alpha 1, isoform CRA_b; Mucin-16; Protein bassoon; Protein disulfide-isomerase-like protein of the testis; Ryanodine receptor 3; Serine/arginine repetitive matrix protein 1; Sperm-specific antigen 2; Titin, isoform CRA_a; Xin actin-binding repeat-containing protein 2 e Keratin, type I cytoskeletal 13.* Estas proteínas comuns tiveram sua diferença de expressão quantificada utilizando a ferramenta SIEVE. A abundância relativa de uma proteína individual a partir do nível do esmalte foi considerada significativamente diferente da dentina quando os valores observados foram inferiores a 0,75 para diminuição e superiores a 1,25 para aumento de abundância, além de o valor de p ser 0,05, o que resultou em 8 proteínas com expressão diferencial (Tabela 9).

Tabela 9 – Quantificação (SIEVE) das proteínas presentes na PA formada sobre o esmalte (E) e dentina (D) em 2 horas

Número de acesso	Descrição	Ratio D/E	p
B5ME49	Mucin-16	1,33	0,002
D3DPG0	Titin, isoform CRA_a	1,34	0,001
E7END2	Sperm-specific antigen 2	0,86	0,001
P13646	Keratin, type I cytoskeletal 13	1,39	0,001
Q5Y190	Anchor protein	2,24	0,001
Q8IYB3	Serine/arginine repetitive matrix protein 1	2,96	0,002
Q8N807	Protein disulfide-isomerase-like protein of the testis	2,04	0,005
Q9UPA5	Protein bassoon	1,34	0,001

Dentre as proteínas comuns a ambos os substratos no tempo de 2 horas, a maioria delas estavam superexpressas em dentina, quando comparadas ao esmalte. Com exceção da *Mucin-16* e da *Keratin, type I cytoskeletal 13*, que são classicamente descritas na PA e também foram comuns a ambos os substratos na PA de 10 minutos (embora estivessem subexpressas na dentina), as demais proteínas não foram descritas em estudos prévios envolvendo a PA. Destacam-se a *Serine/arginine repetitive matrix protein 1*, com ratio D/E de 2,96 e a *Anchor protein*, com ratio D/E de 2,24. A *Serine/arginine repetitive matrix protein 1*. Ambas não tinham ainda sido descritas na PA, de forma que sua função neste integumento não é conhecida. A *Serine/arginine repetitive matrix protein 1* está envolvida em vários eventosdo processamento do pré-mRNA e a *Anchor protein*, cuja evidência ainda se encontra a nível de transcrito, parece ter função molecular relacionada à ligação de íons cálcio, atividade de receptor ligado à proteína G e transporte ativo secundário de sulfato transmembrana (UNIPROT).

Dentre as proteínas **exclusivas** da dentina no tempo de 2 horas (Tabela 10), algumas são classicamente descritas na PA, como a *Annexin A1, Annexin, Carbonic anhydrase 1, Lactoperoxidase, Mucin 4, Mucin-6*, que também foram identificadas com exclusividade na PA formada sobre a dentina em 10 minutos. Entretanto, foram encontradas várias outras proteínas nunca anteriormente descritas na PA e que também não estavam presentes na PA formada sobre a dentina por 10 minutos. Dentre estas foram identificadas muitas proteínas ainda com função desconhecida, cuja evidência existe apenas em nível de transcrito (UNIPROT), como *Basic helix-loop-helix domain-containing protein KIAA2018; BCL-6 corepressor-like protein 1; Chromobox homolog 6; Dynein heavy chain 14, axonemal; Exportin-7; F-box/WD repeat-containing protein 10; NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 13; Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha; Nesprin-1; PHD finger protein 3; Phosphatidylinositol 4-kinase alpha; Protein PRR14L; RING finger and CCCH-type zinc finger domain-containing protein 2; RNA-binding motif protein, X-linked-like-3; Ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat protein Y-linked transcript variant 8.* Mais estudos são necessários para se entender a função destas proteínas no organismo em geral e na PA em especial. Dentre as proteínas com função conhecida no organismo, foi identificada a *Filaggrin*, cuja função é agregar filamentos intermediários de queratina, promovendo a formação de pontes dissulfeto entre eles durante a diferenciação terminal da epiderme de mamíferos (UNIPROT),

tendo, portanto, função estrutural. Outra proteína identificada foi a *Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 14*, que é uma linfotoxina quinase beta ativada que parece estar envolvida exclusivamente na ativação do NF-kappa-β e na sua atividade transcricional. Promove o processamento proteolítico do NFKβ2/P100, o que leva à ativação do NF-kappa-β através da via não canônica (UNIPROT). Sua função na PA, entretanto, ainda não está definida. Foi ainda identificada a *T-complex protein 1 subunit eta (HIV-1 Nef-interacting protein)*, que é uma chaperona molecular, auxiliando no dobramento de proteínas (como a actina e a tubulina), mediante hidrólise de ATP (UNIPROT). Mais recentemente, foi relatado que a *HIV-1 Nef-interacting protein* se liga a dois componentes da subunidade 40S pequena do ribossomo, e em menor extensão a RNA transportador, reduzindo a síntese proteica nas células infectadas por HIV (ABBAS; DICHAMP; HERBEIN, 2012) apresentando, portanto, um papel na defesa do hospedeiro. Assim como foram identificadas proteínas relacionadas à tumorigênese na PA formada sobre a dentina em 10 minutos, na película de 2 horas foi identificada a *SPARC-like protein 1,* que é considerada um marcador da progressão do glioma, pois sua expressão está relacionada com o grau deste tumor (TURTOI et al., 2012).

Dentre as proteínas identificadas exclusivamente na PA formada sobre o esmalte após 2 horas (Tabela 10), foram observadas algumas proteínas clássicas da PA, com função conhecida, como *Cystatin-S; complemet C3; Ig alpha-1 chain C region; Lactoferrin;* algumas isoformas de mucinas *(MUC19 variant 12, Mucin-19, Mucin-17, Mucin-4 beta chain, Mucin-5B)* e *Statherin.*

Tabela 10 - Proteínas presentes exclusivamente na PA formada *in situ* sobre o esmalte e dentina.

	Nº de acesso	Descrição
Esmalte 2 horas	C9JLQ8	Adipocyte enhancer-binding protein 1
	B7ZLW1	CAMSAP1 protein
	Q8N4F0	BPI fold-containing family B member 2
	B4DTX1	cDNA FLJ53196, highly similar to SAM and SH3 domain-containing protein 1
	B7Z582	cDNA FLJ53638, highly similar to Annexin A6
	B7Z6W9	cDNA FLJ54555
	A8K2H9	cDNA FLJ78503, highly similar to Homo sapiens keratin 13 (KRT13), transcript variant 1, mRNA
	P00450	Ceruloplasmin
	Q14781	Chromobox protein homolog 2
	P01036	Cystatin-S
	Q9BXJ5	Complement C1q tumor necrosis factor-related protein 2
	P01024	Complement C3
	B0I1S0	DYNC2H1 variant protein
	Q9P2D7	Dynein heavy chain 1, axonemal
	E9PHM6	Dystonin
	P22681	E3 ubiquitin-protein ligase CBL
	A2RUE7	Glutamate receptor, ionotropic, N-methyl-D-aspartate 3A
	Q9NR48	Histone-lysine N-methyltransferase ASH1L
	P01876	Ig alpha-1 chain C region
	Q96T68	Histone-lysine N-methyltransferase SETDB2
	A1A4E9	Keratin 13
	Q2XSU5	KIR3DL2 (Fragment)
	Q19KS2	Lactoferrin (Fragment)
	E9PGE3	LIM/homeobox protein Lhx8
	Q9NR99	Matrix-remodeling-associated protein 5
	Q6NUQ9	Mitogen-activated protein kinase 8 interacting protein 1
	E9PR05	Histone-lysine N-methyltransferase MLL
	G3CIG0	MUC19 variant 12
	Q7Z5P9	Mucin-19
	E7EPM4	Mucin-17
	H0Y2Y1	Mucin-4 beta chain
	H7BYZ0	Mucin-5B
	Q8N6B4	Myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia/clathrin assembly protein fusion protein
	Q92827	Myosin-ID (Fragment)
	Q5T321	Neurobeachin
	Q9P242	Neuronal tyrosine-phosphorylated phosphoinositide-3-kinase adapter 2
	A2A2V2	RNA-binding protein 34
	P16234	Platelet-derived growth factor receptor alpha
	Q659A9	Putative uncharacterized protein DKFZp547I0910
	Q6MZK8	Putative uncharacterized protein DKFZp686K06110

	Q6GYQ0	Ral GTPase-activating protein subunit alpha-1
	B4DJW3	Renalase
	E7EVZ3	Retinoic acid-induced protein 1
	C9J6S8	Serine/threonine-protein kinase 19
	Q9NQU5	Serine/threonine-protein kinase PAK 6
	Q8IYT8	Serine/threonine-protein kinase ULK2
	O75691	Small subunit processome component 20 homolog
	P02808	Statherin
	E7ERH1	Tensin-1
	G3V220	Transcription elongation regulator 1, isoform CRA_c
	B2RBP0	Zinc finger and BTB domain containing 40, isoform CRA_a
	O60293	Zinc finger C3H1 domain-containing protein
	Q6AHZ1	Zinc finger protein 518[a]
	Nº de acesso	**Descrição**
Dentina 2 horas	Q5JPF3	Ankyrin repeat domain-containing protein 36C
	P04083	Annexin A1
	B5BU38	Annexin
	Q68DE3	Basic helix-loop-helix domain-containing protein KIAA2018
	Q5H9F3	BCL-6 corepressor-like protein 1
	Q562R1	Beta-actin-like protein 2
	B3KVM6	cDNA FLJ16752 fis, clone BRACE2013010, highly similar to Homo sapiens human immunodeficiency virus type I enhancer binding protein 3 (HIVEP3), mRNA
	B3KPT0	cDNA FLJ32143 fis, clone PLACE5000080, highly similar to Absent in melanoma 1 protein
	B3KRD0	cDNA FLJ34045 fis, clone FCBBF2007095, highly similar to AT-hook-containing transcription factor 1
	B3KUK3	cDNA FLJ40080 fis, clone TESTI2001795, highly similar to Homo sapiens regulator of G-protein signalling 22 (RGS22), Mrna
	B4DJU9	cDNA FLJ55278, highly similar to AF4/FMR2 family member 1
	B2RDG4	cDNA, FLJ96597
	E5RH81	Carbonic anhydrase 1 (Fragment)
	B0QXZ6	Chromobox homolog 6
	Q8IWY9	Codanin-1
	Q0VDD8	Dynein heavy chain 14, axonemal
	E7ESC6	Exportin-7
	Q5XX13	F-box/WD repeat-containing protein 10
	P20930	Filaggrin
	H6VRG2	Keratin 1
	P04264	Keratin, type II cytoskeletal 1
	P02538	Keratin, type II cytoskeletal 6A
	Q86Y46	Keratin, type II cytoskeletal 73
	P22079	Lactoperoxidase
	Q99558	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 14
	A0T3F4	Mucin 4
	Q6W4X9	Mucin-6

Q86W25	NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 13
E9PAV3	Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha
E7ENN3	Nesprin-1
E9PE34	PHD finger protein 3
A8MTF1	Phosphatidylinositol 4-kinase alpha
Q9H3B1	PRO1821
H7BZH1	Protein PRR14L
H7BXE0	Rho GTPase-activating protein 40
Q4VXB0	RING finger and CCCH-type zinc finger domain-containing protein 2
Q8N7X1	RNA-binding motif protein, X-linked-like-3
Q14515	SPARC-like protein 1
A8MWI8	T-complex protein 1 subunit eta
H0YC87	Transmembrane protein 25
F4MH59	Ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat protein Y-linked transcript variant 8

Para um melhor entendimento sobre o papel das proteínas da PA encontradas neste estudo, foi feita a classificação de cada proteína a partir do esmalte e dentina formada em 10 minutos e 2 horas. Para isso as proteínas foram classificadas conforme suas interações moleculares, origens e funções, de acordo com o UNIPROT (www.uniprot.org), além dos trabalhos de RISON et al. (2000) e ZIMMERMAN et al., (2013).

As proteínas identificadas nos diferentes grupos estão distribuídas na Tabela 11, com as respectivas classificações. Como pode ser observado, algumas das proteínas identificadas apresentam mais de uma função, origem ou interação.

Tabela 11. Classificação das proteínas identificadas na PA formada *in situ* sobre o esmalte ou dentina nos tempos de 10 minutos e 2 horas.

Nº de acesso	Descrição	Esmalte 10 min	Esmalte 2H	Dentina 10 min	Dentina 2H
Q712M9	5-hydroxytryptamine receptor 4 [a, f, h, r, u]	SIM	-	-	-
H0YEJ5	7-dehydrocholesterol reductase [g, j, r, x]	SIM	-	-	-
Q8TE57	A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 16 [b, h, w]	SIM	-	-	-
P60709	Actin, cytoplasmic 1 [a, d, h, m]	SIM	-	SIM	-
H7C3S1	Actin-binding protein anillin [g, k, r, x]	-	-	SIM	-
C9JLQ8	Adipocyte enhancer-binding protein 1 [g, j, r, x]	-	SIM	-	-
A7E242	A-kinase anchor protein 6 [g, j, r, x]	SIM	-	-	-
Q5Y190	Anchor protein [f, i, l, s]	-	SIM	-	SIM
Q5JPF3	Ankyrin repeat domain-containing protein 36C [g, j, r, x]	-	-	-	SIM
B5BU38	Annexin [a, b, c, d, e, f, h, i, l , m, o, q, s, t]	SIM	-	SIM	SIM
P04083	Annexin A1 [a, c, h, l, s, t]	SIM	-	SIM	SIM
Q6WG78	Antigen MLAA-14 [g, j, r, x]	-	-	SIM	-
H0YHB1	Arf-GAP with GTPase, ANK repeat and PH domain-containing protein 2 [c, h, t, u, v]	SIM	-	-	-
H0YBF7	Arf-GAP with SH3 domain, ANK repeat and PH domain-containing protein 1 [c, h, t, u, v]	SIM	-	-	-
Q09428	ATP-binding cassette sub-family C member 8 [f, h, r, u]	SIM	-	-	-
Q68DE3	Basic helix-loop-helix domain-containing protein KIAA2018 [c, f, i, r x]	-	-	-	SIM
Q5H9F3	BCL-6 corepressor-like protein 1 [a, c, k, r, w]	-	-	-	SIM
Q562R1	Beta-actin-like protein 2 [a, d, h, r, v]	SIM	-	-	SIM
Q8TDL5	BPI fold-containing family B member 1 [b, k, l, s]	SIM	-	-	-
Q8N4F0	BPI fold-containing family B member 2 [b, k, l, s]	-	SIM	-	-
Q2F3K1	Calcium sensing receptor [f, i, q, w]	SIM	-	-	-
F8VZK3	Calcium/calmodulin-dependent 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase 1B [g, i, r, x]	-	-	SIM	-
G3V4C0	Calmin [a, j, r, x]	SIM	-	-	-
Q9UBL0	cAMP-regulated phosphoprotein 21 [a, i, r, w]	SIM	-	-	-
B7ZLW1	CAMSAP1 protein [g,i, r, w]	-	SIM	SIM	-
P23280	Carbonic anhydrase 6 [b, i, l, q, s]	SIM	-	SIM	-
E5RH81	Carbonic anhydrase 1 [g, i, l, s]	-	-	-	SIM
A7LI12	Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 16 [b, j, r, x]	SIM	-	-	-
Q8N3K9	Cardiomyopathy-associated protein 5 [a, h, r, w]	SIM	-	-	-
H0YDW7	CD44 antigen [f, k, r, t]	SIM	-	-	-
B7Z582	cDNA FLJ53638, highly similar to Annexin A6 [a, i, q, u]	-	SIM	-	-
B3KVM6	cDNA FLJ16752 fis, clone BRACE2013010, highly similar to Homo sapiens human immunodeficiency virus type I enhancer binding protein 3 (HIVEP3), mRNA [g, j, r, x]	-	-	-	SIM
B3KPT0	cDNA FLJ32143 fis, clone PLACE5000080, highly similar to Absent in melanoma 1 protein [g, j, r, x]	-	-	-	SIM
B3KRD0	cDNA FLJ34045 fis, clone FCBBF2007095, highly similar to AT-hook-containing transcription factor 1 [g, j, r, x]	-	-	-	SIM
Q8NAT4	cDNA FLJ34815 fis, clone NT2NE2007786 [g, j, r, x]	-	-	SIM	-
B3KS48	cDNA FLJ35471 fis, clone SMINT2006708, highly similar to Homo sapiens ubiquitin specific peptidase 31 (USP31) [g, j, r, x]	SIM	-	-	-
Q8N903	cDNA FLJ38624 fis, clone HEART2008994 [g, j, r, v]	SIM	-	-	-

B3KUK3	cDNA FLJ40080 fis, clone TESTI2001795, highly similar to Homo sapiens regulator of G-protein signalling 22 (RGS22), Mrna [g, j, r, x]	-	-	-	SIM
B3KVY2	cDNA FLJ41718 fis, clone HLUNG2013097, highly similar to SPLICING FACTOR, ARGININE/SERINE-RICH 2 [g, j, r, x]	SIM	-	-	-
B4DMX2	cDNA FLJ51250, highly similar to Plasma kallikrein (EC 3.4.21.34) [b, h, r, x]	SIM	-	-	-
B4DWU6	cDNA FLJ51361, highly similar to Keratin, type II cytoskeletal 6A [d, h, m, v]	-	-	SIM	-
B4DZC0	cDNA FLJ51771, highly similar to SWI/SNF-related matrix-associatedactin-dependent regulator of chromatin subfamily A member5 [c, h, r, x]	-	-	SIM	-
B7Z3F1	cDNA FLJ52429, weakly similar to LIM domain only protein 7 [g,j, r, x]	SIM	-	-	-
B4DNT7	cDNA FLJ53070, highly similar to Macrosialin [f, h, r, x]	SIM	-	-	-
B4DS89	cDNA FLJ53091, highly similar to GDNF family receptor alpha-2 [g, j, r, t]	SIM	-	-	-
B4DTX1	cDNA FLJ53196, highly similar to SAM and SH3 domain-containing protein 1 [g, j, r, x]	-	SIM	-	-
B4E0F0	cDNA FLJ53428, highly similar to Disco-interacting protein 2 homolog A [c, h, r, w]	SIM	-	-	-
B4DL23	cDNA FLJ53512, highly similar to Homo sapiens centrosomal protein 170 kDa (CEP170), transcript variant alpha, mRNA [g, j, r, x]	-	-	SIM	-
B4DWY9	cDNA FLJ53625, moderately similar to WD repeat and FYVE domain-containing protein 3 [g, j, r, x]	SIM	-	-	-
B7Z6W9	cDNA FLJ54555 [g, j, r, x]	-	SIM	-	-
B4DJU9	cDNA FLJ55278, highly similar to AF4/FMR2 family member 1 [g, j, r, x]	SIM	-	-	SIM
B4DRW1	cDNA FLJ55805, highly similar to Keratin, type II cytoskeletal 4 [d, h, m, v]	SIM	-	SIM	-
B7Z3E7	cDNA FLJ56510, highly similar to Tumor suppressor p53-binding protein 1 [g, k, r, x]	SIM	-	-	-
B4E0U5	cDNA FLJ56707, highly similar to Serine/threonine-protein kinase VRK3 (EC 2.7.11.1) [g, h, r, w]	SIM	-	-	-
B4E187	cDNA FLJ60083, highly similar to Zinc finger protein 638 (Fragment) [g, k, r, x]	-	-	SIM	-
B7Z759	cDNA FLJ61672, highly similar to Proteoglycan-4 [g, h, o, w]	SIM	-	-	-
A8K5R2	cDNA FLJ77293, highly similar to Homo sapiens vasohibin 1 (VASH1), mRNA [g, j, r, x]	SIM	-	-	-
A8K8U1	cDNA FLJ77762, highly similar to Homo sapiens cullin-associated and neddylation-dissociated 1 (CAND1), mRNA [g, j, r, x]	SIM	-	-	-
A8K2H9	cDNA FLJ78503, highly similar to Homo sapiens keratin 13 (KRT13), transcript variant 1, mRNA [a, d, e, h, m, v]	-	SIM	SIM	-
A8K2I0	cDNA FLJ78504, highly similar to Homo sapiens keratin 6A (KRT6A), mRNA [d, h, m, v]	SIM	-	-	-
B2RDG4	cDNA, FLJ96597 [g, j, r, x]	-	-	-	SIM
P00450	Ceruloplasmin [b, h, r, u]	-	SIM	-	
B0QXZ6	Chromobox homolog 6 c' [j, r, x]	-	-	-	SIM
Q14781	Chromobox protein homolog 2 [c, k, l, v]	-	SIM	-	-
O14646	Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 1 [a, c, h, r, w]	-	-	SIM	-
P01036	Cystatin-S [a, b, f, h, n, t]	SIM	SIM	SIM	-
F5H2E2	CLIP-associating protein 1 [g, j, r, t]	SIM	-	-	-
P48444	Coatomer subunit delta [a, f, h, r, x]	-	-	SIM	-
Q8IWY9	Codanin-1 [a, c, f, k, f, t]	SIM	-	-	SIM
Q02388	Collagen alpha-1(VII) chain [b, h, m, v]	SIM	-	-	-
C9J3Q2	Collagen, type XVII, alpha 1, isoform CRA_b [b, h, m, v]	-	SIM	-	SIM
Q9BXJ5	Complement C1q tumor necrosis factor-related protein 2 [b, j, l, s]	-	SIM	-	-
P01024	Complement C3 [b, f, k, l, o, s]	-	SIM	SIM	-
B3KQY9	DNA-directed RNA polymerase [g, h, r, x]	SIM	-	-	-

B3KRQ8	DNA-directed RNA polymerase [g, h, r, x]	SIM	-	-	-
B0I1S0	DYNC2H1 variant protein [g, k, r, x]	-	SIM	-	-
Q9P2D7	Dynein heavy chain 1, axonemal [a, d, k, r, x]	-	SIM	-	-
Q0VDD8	Dynein heavy chain 14, axonemal [a, d, h, r, w]	-	-	-	SIM
E9PHM6	Dystonin [g, k, r, x]	-	SIM	-	-
P22681	E3 ubiquitin-protein ligase CBL a, [c, f, k, l, m, t]	-	SIM	-	-
Q63HN8	E3 ubiquitin-protein ligase RNF213 [a, h, r, t]	SIM	-	-	-
Q14511	Enhancer of filamentation 1 [a, d, h, t]	SIM	-	-	-
E9PPH6	Exophilin-5 [g,j, r, x]	-	-	SIM	-
E7ESC6	Exportin-7 [c, j, r, u]	-	-	-	SIM
Q5XX13	F-box/WD repeat-containing protein 10 [g, j, r, x]	SIM	-	-	SIM
Q5CZC0	Fibrous sheath-interacting protein 2 [g, j, r, x]	SIM	-	-	-
P20930	Filaggrin [a, i, m, v]	-	-	-	SIM
F8W9W2	G protein-coupled receptor kinase 6 [g, k, r, w]	SIM	-	-	-
E7EV53	Gamma-aminobutyric acid receptor subunit alpha-6 [f, k, r, u]	SIM	-	-	-
E7EV50	Gamma-aminobutyric acid receptor subunit beta-2 [f, k, r, u]	SIM	-	-	-
A2RUE7	Glutamate receptor, ionotropic, N-methyl-D-aspartate 3A [f, h, r, w]	-	SIM	-	-
C9J3Q2	Glutaminase liver isoform, mitochondrial [g, h, l, s]	SIM	-	-	-
H0Y6I0	Golgin subfamily A member 4 [g, j, r, x]	SIM	-	-	-
D3DX70	GRIP and coiled-coil domain containing 2, isoform CRA_a [g, j, r, x]	-	-	SIM	-
Q86Y00	GTF2IRD2B protein [g, j, r, w]	SIM	-		-
G5EA02	HCG21296, isoform CRA_c [g,j, r, x]	-	-	SIM	-
O14686	Histone-lysine N-methyltransferase 2D [c, k, l, m, s]	SIM	-	-	-
Q9NR48	Histone-lysine N-methyltransferase ASH1L [c, h, r, w]	-	SIM	SIM	-
E9PR05	Histone-lysine N-methyltransferase MLL [b, j, r, x]	-	SIM	-	-
Q96T68	Histone-lysine N-methyltransferase SETDB2 [c, h, r, w]	-	SIM	-	-
P10915	Hyaluronan and proteoglycan link protein 1 [b, k, r, v]	SIM	-	SIM	-
P01876	Ig alpha-1 chain C region [b, f, h, n, o, v]	-	SIM		-
P01877	Ig alpha-2 chain C region [b, f, h, n, o, v]	-	-	SIM	-
P01857	Ig gamma-1 chain C region [b, f, h, n, o, v]	-	-	SIM	-
P01861	Ig gamma-4 chain C region [b, f, h, n, o, v]	-	-	SIM	-
P01591	Immunoglobulin J chain [f, k, r, t]	SIM	-	-	-
D6RHJ6	Immunoglobulin J chain [f, k, r, t]	SIM	-	-	-
Q93033	Immunoglobulin superfamily member 2 [f, k, r, t]	-	-	SIM	-
Q59EZ3	Insulin-like growth factor 2 receptor variant [a, j, r, x]	-	-	SIM	-
Q9H1B7	Interferon regulatory factor 2-binding protein-like [c, k, r, x]	SIM	-	-	-
H6VRG2	Keratin 1 [d, h, l, o, v]	SIM	-	-	SIM
A1A4E9	Keratin 13 [a, d, e, h, m, v]	SIM	SIM	-	-
P13646	Keratin, type I cytoskeletal 13 [b, h, m, v]	SIM	SIM	SIM	SIM
P02533	Keratin, type I cytoskeletal 14 [d, h, m, v]	SIM	-	SIM	-
P04264	Keratin, type II cytoskeletal 1 [d, f, h, , m, v]	SIM	-	SIM	SIM
P02538	Keratin, type II cytoskeletal 6A [d, e, f, h, m, v]	SIM	-	SIM	SIM
Q86Y46	Keratin, type II cytoskeletal 73 [g, j, m, v]	-	-	-	SIM
A5YKK5	KIAA0232 [g, j, r, x]	SIM	-	-	-
Q9BTI0	KIAA1632 protein [g, j, r, x]	-	-	SIM	-
Q2XSU5	KIR3DL2 (Fragment) [g, j, r, x]		SIM		

Q19KS2	Lactoferrin [b, h, n, u]	-	SIM	-	-
P22079	Lactoperoxidase [a, b, c, e, i, n, q]	-	-	-	SIM
B1AL11	Leucine zipper putative tumor suppressor 2 [g,j, r, x]	-	-	SIM	-
E9PGE3	LIM/homeobox protein Lhx8 [c, h, r, u, w]	-	SIM	-	-
Q5T7N2	LINE-1 type transposase domain-containing protein 1 [g, j, r, x]	SIM	-	-	-
Q13136	Liprin-alpha-1 [a, k, r, v]	SIM	-	-	-
B7Z2A6	Liprin-alpha-2 [a, j, r, v]	SIM	-	-	-
Q6ZWB8	MAP6 protein [g,l, r, x]	-	-	SIM	-
F5H689	Maternal embryonic leucine zipper kinase [f, h, r, x]	-	-	SIM	-
Q9NR99	Matrix-remodeling-associated protein 5 [b, j, r, v]	-	SIM	SIM	-
Q5TCQ9	Membrane-associated guanylate kinase, WW and PDZ domain-containing protein 3 [c, f, k, r, x]	SIM	-	-	-
F8WEW5	Membrane-associated phosphatidylinositol transfer protein 3 [f, i, r, x]	SIM	-	-	-
H7C066	Methyl-CpG-binding domain protein 5 (Fragment) [g, j, r, x]	SIM	-	-	-
Q6NUQ9	Mitogen-activated protein kinase 8 interacting protein 1 [g, j, r, w]	-	SIM	-	-
Q99558	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 14 [c, h, r, w]	-	-	-	SIM
G3CIG0	MUC19 variant 12 [b, j, p, x]	SIM	SIM	SIM	-
G3CIH4	MUC19 variant 17 (Fragment) [g, j, p, x]	SIM	-	-	-
G3CIH6	MUC19 variant 19 (Fragment) [g, j, p, x]	SIM	-	-	
Q9Y3S4	MUC-B1 protein [g, j, p, x]	SIM	-	-	-
P98088	Mucin-5AC (Fragments) [a, b, e, h, m, n, p, q, s]	SIM	-	-	-
H0Y2Y1	Mucin-4 beta chain [g, j, p, x]	-	SIM	-	-
G3CIG0	MUC19 variant 12 [b, j, p, x]	-	-	SIM	-
B1AVQ5	Mucin 1, cell surface associated [g, j, p, x]	-	-	SIM	-
E9PJC5	Mucin-6 (Fragment) [g, j, p, x]	-	-	SIM	-
A0T3F4	Mucin 4 [g, j, p, x]	SIM	-	SIM	SIM
B5ME49	Mucin-16 [g, j, p, x]	SIM	SIM	-	SIM
Q8WXI7	Mucin-16 [b, f, h, p, t]	SIM		SIM	-
E7EPM4	Mucin-17 [g, h, p, x]	-	SIM	SIM	-
Q7Z5P9	Mucin-19 [b, h, p, t]	-	SIM	-	-
Q9HC84	Mucin-5B [b, k, p, t]	SIM	SIM	-	-
Q6W4X9	Mucin-6 [b, k, p, t]	SIM	-	-	SIM
Q8N6B4	Myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia/clathrin assembly protein fusion protein [g, k, r, x]	-	SIM	-	-
A8MX12	Myomesin-1 [g, j, r, x]	SIM	-	-	-
A6NIU4	Myomesin-3 [g, j, r, x]	SIM	-	-	-
Q14324	Myosin-binding protein C, fast-type [a, h, m, r, v]	-	-	SIM	-
Q92827	Myosin-ID [g, j, r, x]	SIM	SIM	-	-
Q86W25	NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 13 [g, j, r, x]	-	-	-	SIM
E9PAV3	Nascent polypeptide-associated compleSIM subunit alpha [g, j, r, x]	SIM	-	-	SIM
Q14214	Nebulin [g, j, r, x]		-	SIM	-
H0YA93	NEDD4-binding protein 2 [g, j, r, x]	SIM	-	-	-
E7ENN3	Nesprin-1 [a, c, f, j, r, x]	-	-	-	SIM
Q5T321	Neurobeachin [g, j, r, x]	-	SIM	-	-
Q09666	Neuroblast differentiation-associated protein AHNAK [c, j, r, s]	-	-	SIM	-
Q9P242	Neuronal tyrosine-phosphorylated phosphoinositide-3-kinase adapter 2 [g, k, r, w]	-	SIM	-	-
P80188	Neutrophil gelatinase-associated lipocalin a, [b, h, r, x]	-	-	SIM	-

B7Z9A6	N-sulphoglucosamine sulphohydrolase [g, j, r, x]	SIM	-	-	-
Q6P4R8	Nuclear factor related to kappa-B-binding protein [c, k, r, w]	SIM	-	-	-
C9JCR8	Nuclear receptor coactivator 3 [a, c, k, r, w]	SIM	-	-	-
Q05BP9	OLIG2 protein [a, c, k, r, s]	SIM	-	-	-
Q8NDF8	PAP-associated domain-containing protein 5 [a, c, k, r, t, w]	SIM	-	-	-
Q9GZU2	Paternally-eSIMpressed gene 3 protein [a, c, k, r, s]	SIM	-	-	-
Q8NEN9	PDZ domain-containing protein 8 [a, k, r, v]	SIM	-	-	-
Q96Q06	Perilipin-4 [f, j, r, s]	SIM	-	SIM	-
E9PE34	PHD finger protein 3	-	-	-	SIM
G3V470	Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate 3-phosphatase and dual-specificity protein phosphatase PTEN [c, k, r, w]	SIM	-	-	
A8MTF1	Phosphatidylinositol 4-kinase alpha [g, h, r, w]	-	-	-	SIM
P16234	Platelet-derived growth factor receptor alpha [a, c, k, s, w]	-	SIM	-	-
C9JMW3	Poliovirus receptor-related protein 3 [g, j, r, x]	-	-	SIM	-
Q7Z443	Polycystic kidney disease protein 1-like 3 [f, h, r, s, u]	SIM	-		-
P01833	Polymeric-immunoglobulin receptor [b, j, r, x]		-	SIM	-
A5A3E0	POTE ankyrin domain family member F [a, j, r, x]	SIM	-	-	-
Q32Q83	PPIL4 protein [c, k, r, x]	SIM	-	-	-
Q4G0U5	Primary ciliary dyskinesia protein 1 [g, j, r, x]	-	-	SIM	-
Q9H3B1	PRO1821 [g, j, r, x]	-	-	-	SIM
Q9Y4D8	Probable E3 ubiquitin-protein ligase HECTD4 [a, f, k, r, x]	SIM	-	-	-
P12273	Prolactin-inducible protein [b, h, r, x]	SIM	-	SIM	-
E9PL31	Proline-rich protein 18 (Fragment) [g, i, q, x]	SIM	-	-	-
Q9UPA5	Protein bassoon [a, c, d, h, r, x]	SIM	SIM	SIM	SIM
Q8N807	Protein disulfide-isomerase-like protein of the testis [g, k, r, s]	SIM	SIM	SIM	SIM
Q9ULI3	Protein HEG homolog 1 [f, i, s, v]	SIM	-	SIM	-
Q5T8A7	Protein phosphatase 1 regulatory subunit 26 [c, k, r, w]	-	-	SIM	-
H7BZH1	Protein PRR14L [g, j, r, x]	-	-	-	SIM
H7C2P2	Protein sidekick-2 [g, j, r, x]	-	-	SIM	-
Q59H55	Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 13 isoform 2 variant [d, k, r, w]	-	-	SIM	-
Q9Y5I3	Protocadherin alpha-1 [f, i, s]	SIM	-	-	-
A2A3N6	Putative PIP5K1A and PSMD4-like protein [a, k, r, x]	SIM	-	-	-
Q9C0F0	Putative Polycomb group protein ASXL3 [c, k, r, w]	SIM	-	-	-
A8MT19	Putative rhophilin-2-like protein [g, j, r, x]	-	-	SIM	-
Q659A9	Putative uncharacterized protein DKFZp547I0910 [g, j, r,x]	-	SIM	-	-
Q5JV90	Putative uncharacterized protein DKFZp564P1772 [g, k , r, x]	SIM	-	-	-
Q63HQ7	Putative uncharacterized protein DKFZp686A1736 [m, j, r, x]	SIM	-	-	-
Q6MZW0	Putative uncharacterized protein DKFZp686J11235 [g, j, r,x]	SIM		-	-
Q6MZK8	Putative uncharacterized protein DKFZp686K06110 [g, j, r,x]	-	SIM	-	-
Q6WKZ4	Rab11 family-interacting protein 1 [a, k, r, w]	-	-	SIM	-
Q6GYQ0	Ral GTPase-activating protein subunit alpha-1 [a, c, k, r, w]	-	SIM	-	-
E7EX08	Regulating synaptic membrane exocytosis protein 1 [g, i, r, s]	SIM	-	-	-
F8W6W8	Regulating synaptic membrane exocytosis protein 2 [g, j, r, s]	-	-	SIM	-
G3V112	Regulator of G-protein signaling 22 [g, j, r, x]	SIM	-	-	-
B4DJW3	Renalase [g, j, r, x]	-	SIM	-	-
A0PJ83	REST protein [g, j, r, x]	SIM	-	-	-

E7EVZ3	Retinoic acid-induced protein 1 [g, j, r, x]	-	SIM	-	-
Q59HG6	Rho GTPase activating protein 6 isoform 1 variant [g, j, r, x]	SIM	-	-	-
H7BXE0	Rho GTPase-activating protein 40 [g, j, r, t]	-	-	-	SIM
B4DR10	Rho-GTPase-activating protein 7 [d, f, h, s, v]	SIM	-	-	-
B3KX27	Rhophilin-2 [g, j, r, x]	SIM	-	-	-
B1APS8	Ribosomal protein S6 kinase delta-1 [a, f, h,r, x]	SIM	-	-	-
Q4VXB0	RING finger and CCCH-type zinc finger domain-containing protein 2 [c, j, r, x]	-	-	SIM	SIM
Q8N7X1	RNA-binding motif protein, X-linked-like-3 [g, j, r, x]	-	-	-	SIM
A2A2V2	RNA-binding protein 34 [c, j, r, x]	SIM	SIM	SIM	-
H0YGL9	Ryanodine receptor 2 [f, i, r, x]	SIM	-	-	-
Q15413	Ryanodine receptor 3 [f, i, r, x]	SIM	SIM	SIM	SIM
Q6UWB4	Serine protease 55 [f, k, r, x]	SIM	-	-	-
Q8IYB3	Serine/arginine repetitive matrix protein 1 [a, c, k, r, w]	SIM	SIM	SIM	SIM
C9J6S8	Serine/threonine-protein kinase 19 [g, j, r, x]	-	SIM	-	-
Q9NQU5	Serine/threonine-protein kinase PAK 6 [a, c, h, r, w]	-	SIM	SIM	-
Q96Q15	Serine/threonine-protein kinase SMG1 [a, c, k, r, x]	SIM	-	-	-
Q8IYT8	Serine/threonine-protein kinase ULK2 [a, h, r, t]	-	SIM	-	-
Q9H7U1	Serine-rich coiled-coil domain-containing protein 2 [g, j, r, x]	SIM	-	-	-
Q9Y6X0	SET-binding protein [c, j, r, x]	SIM	-	-	-
H7C1X5	SH3 and multiple ankyrin repeat domains protein 2 [g, j, r, x]	-	-	SIM	-
A6NHU9	SH3 and multiple ankyrin repeat domains protein 2 [g, j, r, x]	-	-	SIM	-
O75691	Small subunit processome component 20 homolog [a, c, h, r, w]	-	SIM	-	-
E7ET49	Sn1-specific diacylglycerol lipase beta [g, j, r, s]	SIM	-	-	-
Q5SXM2	snRNA-activating protein complex subunit 4 [c, j, r, w]	SIM	-	-	-
O94875	Sorbin and SH3 domain containing 2 [a, c, d, h, m, v]	SIM	-	-	-
Q14515	SPARC-like protein 1 [g, i, r, x]		-	-	SIM
Q7RTM4	Spectrin-like protein of the nuclear envelope and Golgi [a, j, r, x]	SIM	-	-	-
Q76KD6	Speriolin [g, j, r, x]	SIM	-	-	-
E7END2	Sperm-specific antigen 2 [g, j, r, x]	SIM	SIM	-	SIM
B3KUY1	Splicing factor, arginine/serine-rich 2, isoform CRA_d [c, j, r, w]	SIM	-	-	-
Q9P2P6	StAR-related lipid transfer protein 9 [c, k, r, v]	-	-	SIM	-
P02808	Statherin [b, f, h, l, p, q, s]	SIM	SIM	-	-
Q7Z7G0	Target of Nesh-SH3 [b, k,r, v]	SIM	-	-	-
O60343	TBC1 domain family member 4 [a, k, r, t]	SIM	-	-	-
A8MWI8	T-complex protein 1 subunit eta [a, j, r, w]	-	-	-	SIM
E7ERH1	Tensin-1 [g, k, r, x]	SIM	SIM	SIM	-
Q13647	Testis specific basic protein [g, j, r, x]	-	-	SIM	-
D3DPG0	Titin, isoform CRA_a [c, i, r, w]	SIM	SIM	SIM	SIM
G3V220	Transcription elongation regulator 1, isoform CRA_c [c, j, r, w]	-	SIM	-	-
Q6PRX2	Transducin-like enhancer of split 3 splice variant 2 [g, j, r, s, w]	SIM	-	-	-
F8WCH2	Transducin-like enhancer protein 2 [c, k, r, w]	-	-	SIM	-
H0Y2M0	Transmembrane protein 131-like [g, j, r, w]	SIM	-	-	-
H0YC87	Transmembrane protein 25 [g, j, r, x]	-	-	-	SIM
Q7Z2Z1	Treslin [c, h, r, w]	-	-	SIM	-
Q9HCJ0	Trinucleotide repeat-containing gene 6C [c, h, l, m, o, s, v]	SIM	-	-	-
Q9H2D6	TRIO and F-actin-binding protein [a, c, d, h, m, t ,v]	SIM	-	-	-

B4DIL8	Tuberin [a, c, j, w]	SIM	-	-	-
Q86U96	TUBGCP2 protein [g, j, r, w]	-	-	SIM	-
Q9UIG0	Tyrosine-protein kinase BAZ1B [c, h, r, w]	-	-	SIM	-
Q6ZU65	Ubinuclein-2 [c, j, r, x]	SIM	-	-	-
D3DVA8	Ubiquilin 4, isoform CRA_a [c, j, r, x]	SIM	-	-	-
B7WPF4	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase [g, j, r, s]	SIM	-	-	-
Q70CQ4	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 31 [g, h, r, s]	-	-	SIM	-
F4MH43	Ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat protein Y-linked transcript variant 4 [g, j, r, x]	SIM	-	-	-
E1U1M3	Ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat protein Y-linked transcript variant 47 [g, j, r, x]	SIM	-	-	-
F4MH91	Ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat protein Y-linked transcript variant 49 [g, j, r, x]	-	-	SIM	-
E1U199	Ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat protein Y-linked transcript variant 56 [c, h, r, s]	-	-	SIM	-
F4MH59	Ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat protein Y-linked transcript variant 8 [g, j, r, x]	-	-	-	SIM
Q68DN1	Uncharacterized protein C2orf16 [g, j, r, x]	-	-	SIM	-
A6NGG8	Uncharacterized protein C2orf71 [g, j, r, x]	SIM	-	-	-
Q9UF83	Uncharacterized protein DKFZp434B061 [g, j, r, x]	SIM	-	-	-
Q8N7P7	Uncharacterized protein FLJ40521 [g, j, r, x]	SIM	-	-	-
Q9Y2F5	Uncharacterized protein KIAA0947 [g, j, r, x]	SIM	-	-	-
Q96PY0	Uncharacterized protein KIAA1908 [g, j, r, x]	SIM	-	-	-
Q5HYC2	Uncharacterized protein KIAA2026 [g, j, r, x]	SIM	-	-	-
Q5T230	Undifferentiated embryonic cell transcription factor 1 [c, h, r, x]	-	-	SIM	-
O75445	Usherin [a, h, r, v]	SIM	-	-	-
Q6IRT0	USP32 protein [g, j, r, w]	SIM	-	-	-
B7Z6A0	UV radiation resistance-associated gene protein [g, j, r, x]	SIM	-	-	-
Q15061	WD repeat-containing protein 43 [g, j, r, x]	-	-	SIM	-
P30291	Wee1-like protein kinase [a, c, h, r, s, t]	-	-	SIM	-
A4UGR9	Xin actin-binding repeat-containing protein 2 [g, j, r, v]	SIM	SIM	SIM	SIM
Q9ULM3	YEATS domain-containing protein 2 [a, g, r, w]	SIM	-	-	-
B2RBP0	Zinc finger and BTB domain containing 40, isoform CRA_a g, k, r, w	-	SIM	-	-
O60293	Zinc finger C3H1 domain-containing protein [g, k, r, w]	-	SIM	-	-
P15822	Zinc finger protein 40 [a, c, h, r, w]	SIM	-	-	-
Q59FE0	Zinc finger protein 41 variant [g, i, r, w]	SIM	-	-	-
Q6AHZ1	Zinc finger protein 518A [c, k, r, w]	-	SIM	-	-
H0YC29	Zinc finger transcription factor Trps1 (Fragment) [g, j, r, x]	-	-	SIM	-
O43149	Zinc finger ZZ-type and EF-hand domain-containing protein 1 [g, i, r, w]	SIM	-	-	-

As proteínas foram classificadas de acordo com a ***origem*** utilizando os dados do UNIPROT e o artigo de Zimmerman et al. (2013): a) citoplasma; b) extracelular; c) núcleo; d) citoesqueleto; e) intracelular; f) Membrana; g) Origem desconhecida. Em relação às ***interações proteicas***, a classificação foi baseada em Zimmerman et al. (2013): h) proteína/proteína; i) cálcio/fosfato; j) interação molecular desconhecida; k) outras interações moleculares. Conforme a ***função na PA***, a classificação foi baseada em Zimmerman et al. (2013): l) metabolismo; m) regeneração de tecidos; n) antimicrobiana; o) resposta Imune; p) lubrificação; q) biomineralização; r) função desconhecida. Quanto à função geral, a classificação foi baseada em Rison et al. (2000): s) metabolismo; t) processos celulares; u) transporte; v) estrutura e organização estrutural; w) vias de informação; x) miscelânea.

A classificação das proteínas identificadas conforme sua origem foi dividida em sete categorias, a saber: citoplasma, extracelular, núcleo, citoesqueleto, membrana, desconhecidas e proteínas que apresentavam mais que uma origem. As buscas para a classificação foram realizadas utilizando o número de acesso de cada proteína no UNIPROT (www.uniprot.org), tanto para o grupo de proteínas da PA formada sobre o esmalte quanto para o grupo da dentina, nos diferentes tempos de 10 minutos e 2 horas.

Para o grupo de esmalte 10 minutos (Figura 14), a maior parte das proteínas identificadas na PA tinha origem desconhecidas (43%). Dentre todos os grupos avaliados, este foi o que apresentou o maior número de proteínas identificadas (160), e dentre elas haviam um grande número de proteínas denominadas "*cDNA*" (DNA complementar), cuja evidência no UNIPROT estava a nível de transcrito apenas, além de terem sido identificadas várias proteínas ainda não caracterizadas. Dentre as proteínas com uma única origem conhecida, a maioria eram proteínas de membrana (10%), seguido por proteínas de origem extracelular (9%), nuclear (9%), citoplasmática (8%) ou proveniente do citoesqueleto (4%). As proteínas identificadas de origem extracelular são secretadas a partir das glândulas salivares maiores e menores. Sabe-se que as glândulas salivares são responsáveis por mais de 90% do volume de saliva produzida. A presença de proteínas derivadas do citoplasma advém da alta rotatividade da mucosa bucal (ZIMMERMAN et al., 2013). Algumas proteínas identificadas possuem mais que uma origem, representando 17% neste grupo. Dentre elas encontram-se a *Annexin* (citoplasma, extracelular, núcleo, citoesqueleto, membrana)*, Annexin A1* (Citoplasma e núcleo)*, Cystatin-S* (citoplasma e membrana) *Keratin 13 e Mucin-5AC* (Citoplasma, extracelular e organela), dentre outras.

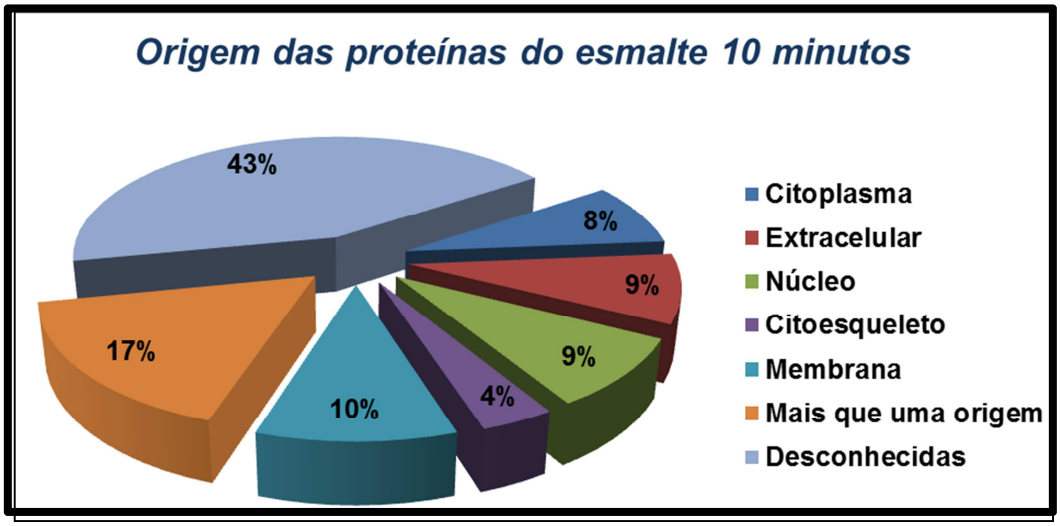


Figura 14. Distribuição da origem das proteínas identificadas na PA formada sobre o esmalte por 10 minutos.

A Figura 15 representa a classificação das proteínas identificadas no esmalte, no período de 2 horas, classificadas de acordo com a sua origem. Como relatado para o período de 10 minutos, a maior parte das proteínas (48%) tinha origem desconhecida. Dentre as proteínas com origem conhecida, a maioria delas era extracelular (13%) ou do núcleo (9%). O número de proteínas com origem na membrana (5%), citoplasma (3%) e citoesqueleto (2%) foi menor comparado com o tempo de 10 minutos. Neste grupo também existiam algumas proteínas com evidencias em nível de transcrito e não caracterizadas, além de proteínas com mais que uma origem (20%), como: *Complement C3* e *Cystatin- S* (citoplasma e membrana), *Ig alpha-1 chain C region* (extracelular e membrana), *Keratin, type I cytoskeletal 13* (extracelular e citoesqueleto), *Protein bassoon* (citoplasma, núcleo e citoesqueleto).

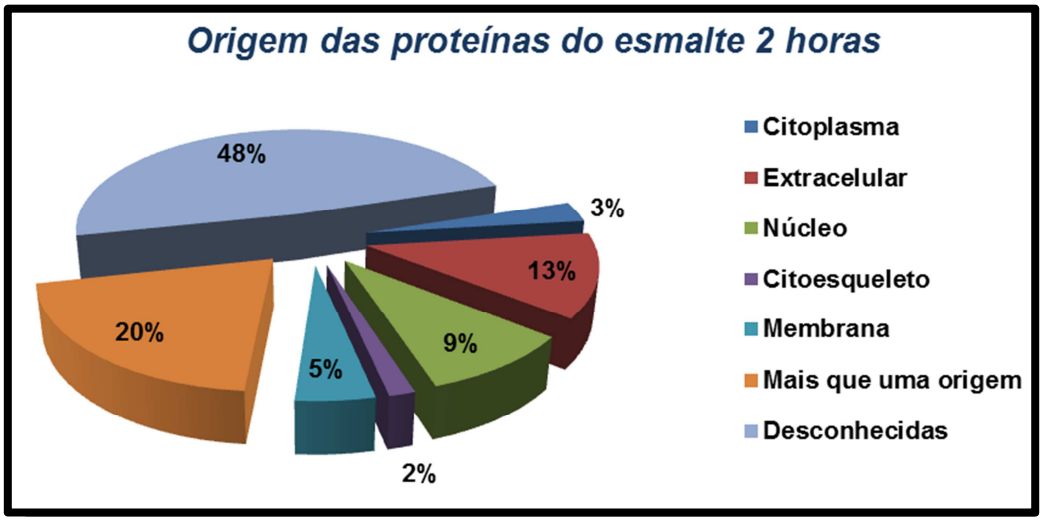


Figura 15. Distribuição da origem das proteínas identificadas na PA formada sobre o esmalte por 2 horas.

Para as 86 proteínas da PA formadas em 10 minutos na dentina (Figura 16), o agrupamento foi realizado da mesma forma que o esmalte. Como observado para o esmalte, à maioria das proteínas identificadas tinha origem desconhecida. Dentre aquelas com uma origem conhecida, diferentemente do esmalte a maioria era de origem nuclear (17%), seguida pelas proteínas com origem no citoplasma (6%), extracelular (6%), citoesqueleto (6%) e na membrana (5%). Uma alta porcentagem das proteínas identificadas também apresentava mais que uma origem (21%), dentre as quais se encontravam proteínas clássicas da PA, como as anexinas, cistatinas, imunoglobulinas, queratinas e mucinas.

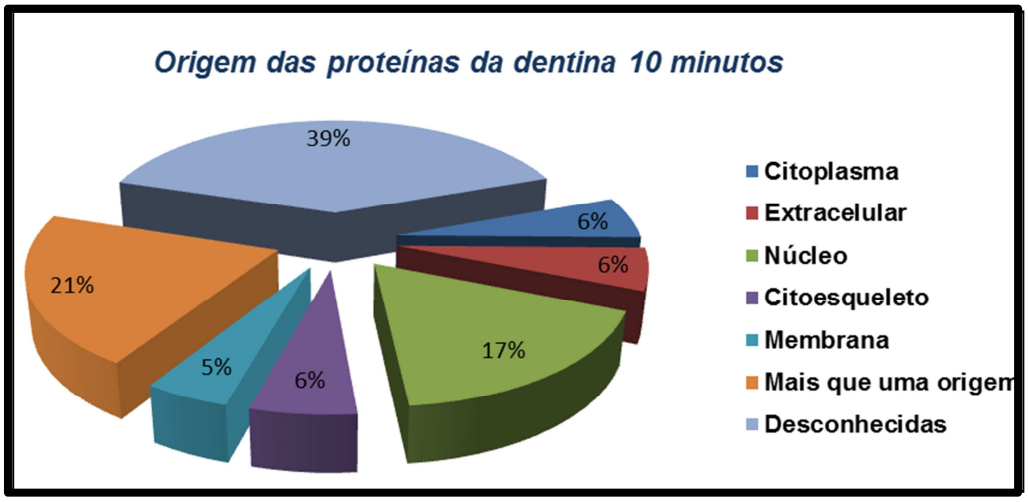


Figura 16. Distribuição da origem das proteínas identificadas na PA formada sobre a dentina por 10 minutos.

Um perfil semelhante foi observado para as 52 proteínas formadas sobre a dentina no período de 2 horas (Figura 17), sendo 55% de origem desconhecida, 8% de origem nuclear, 6% de membrana, 4% do citoesqueleto, 4% extracelular e 2% citoplasmáticas. Também houve proteínas identificadas que apresentavam mais que uma origem (21%), dentre elas algumas anteriormente já citadas na dentina 10 minutos.

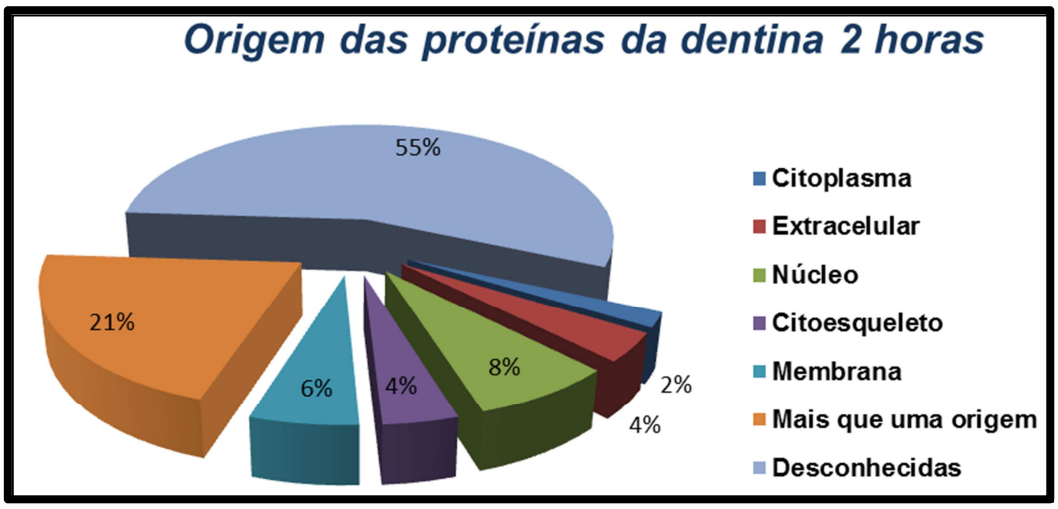


Figura 17. Distribuição da origem das proteínas identificadas na PA formada sobre a dentina por 2 horas.

As proteínas identificadas também foram classificadas de acordo com suas características funcionais, a saber: 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 da PA formadas sobre o esmalte por 10 minutos (Figura 18), a maioria apresenta função desconhecida (45%). Dentre aquelas com função conhecida, 17% estão relacionadas com vias de informação, 16% com estrutura e organização da estrutura, 9% com metabolismo e processos celulares e 4% com transporte.

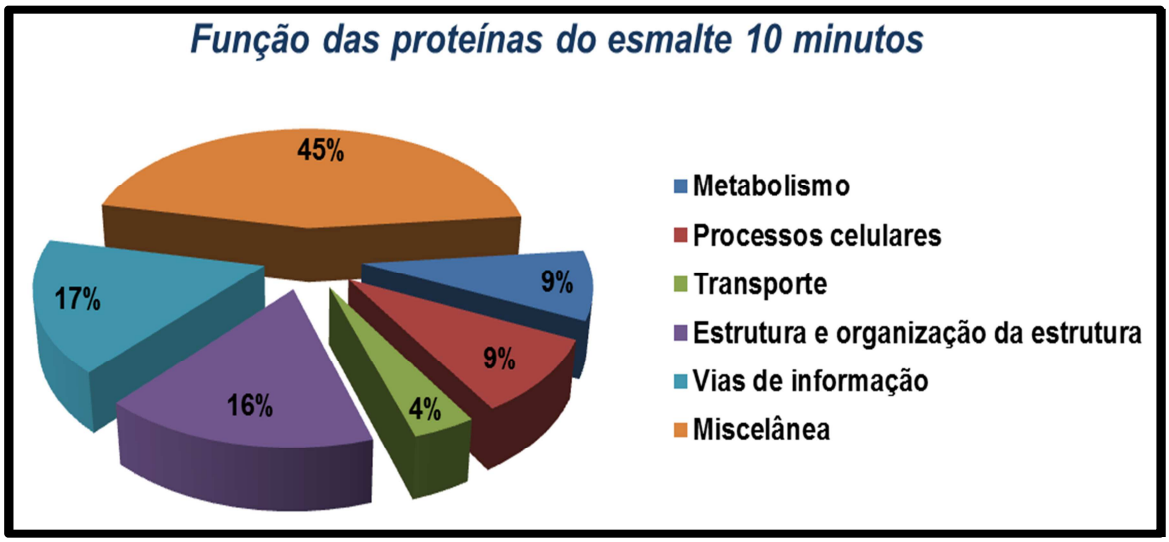


Figura 18. Distribuição funcional das proteínas identificadas na PA formada sobre o esmalte 10 minutos, de acordo com Rison (RISON; HODGMAN; THORNTON, 2000).

Perfil semelhante foi observado para as proteínas da PA formada sobre o esmalte por 2 horas (Figura 19), com a maioria das proteínas identificadas apresentando função desconhecida, enquanto que 14% estão relacionadas com vias de informação, 9% com metabolismo, 8% com estrutura e organização estrutural e processos celulares e 6% com transporte. Em adição, 5% das proteínas identificadas apresentam mais que uma função.

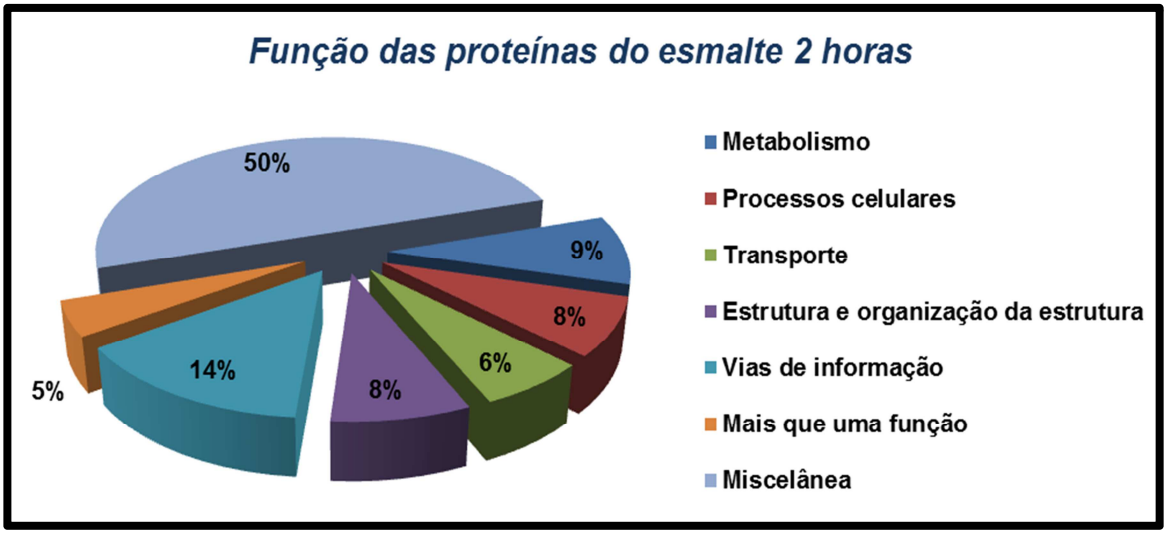


Figura 19. Distribuição funcional das proteínas identificadas na PA formada sobre o esmalte 2 horas, de acordo com Rison (RISON; HODGMAN; THORNTON, 2000).

Já o perfil funcional obtido para as proteínas identificadas na PA formada sobre a dentina foi um pouco diferente daquele observado para o esmalte. Para o tempo de 10 minutos (Figura 20), 45% das proteínas apresentam função desconhecida, 16% estão relacionadas com estrutura e organização da estrutura, 15% com vias da informação, 13% com metabolismo e 4% com processos celulares, sendo que 7% das proteínas identificadas apresentam mais que uma função.

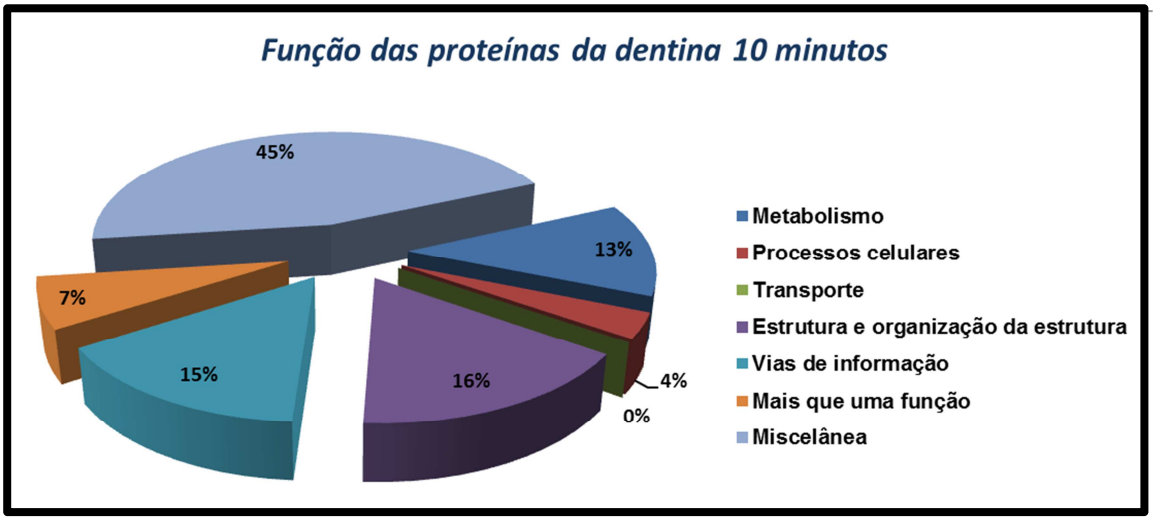


Figura 20. Distribuição funcional das proteínas identificadas na PA formada sobre a denrtina formada em 10 minutos, de acordo com Rison (RISON; HODGMAN; THORNTON, 2000)

Na PA formada sobre a dentina após 2 horas (Figura 21), as proteínas apresentaram-se em maior parte com função também relacionada à estrutura e organização da estrutura (15%). Houve uma pequena diminuição na porcentagem de proteínas relacionadas com vias de informação em comparação com o tempo de 10 minutos (9%), assim como para as proteínas relacionadas com metabolismo (8%). Contudo, houve um aumento nas proteínas relacionadas com processos celulares (8%) e transporte (2%), além das proteínas apresentando mais que uma função (8%). 50% das proteínas identificadas tinham função desconhecida.

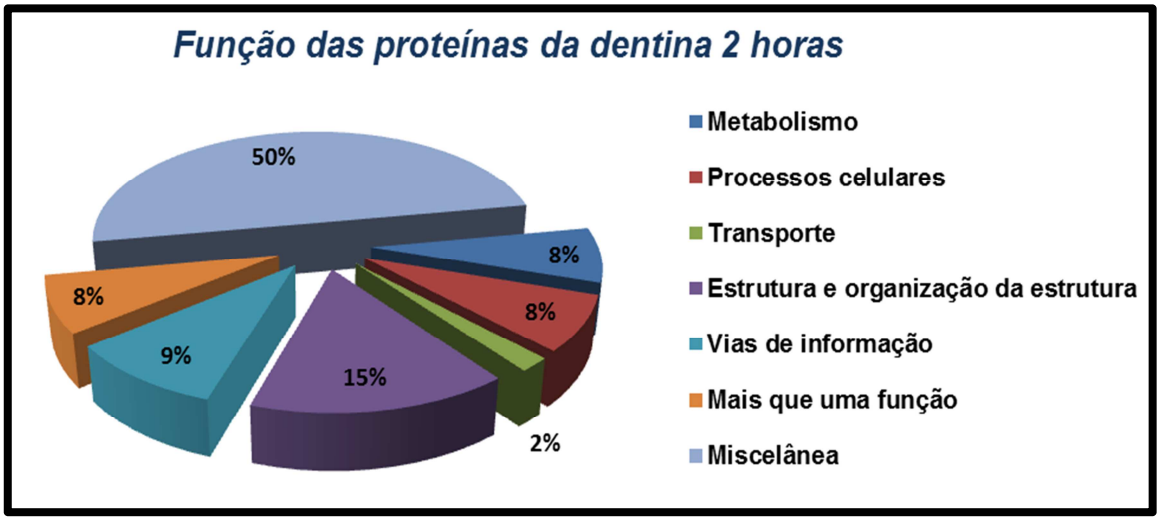


Figura 21. Distribuição funcional das proteínas identificadas na PA formada sobre a denrtina formada em 2 horas, de acordo com Rison (RISON; HODGMAN; THORNTON, 2000)

Sendo a PA determinada pela adsorção seletiva de proteínas derivadas a partir da saliva, devido às interações eletrostáticas e moleculares, as proteínas foram classificadas com base nas suas formas de interação, a saber: 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).

No grupo de proteínas da PA formada sobre o esmalte após 10 minutos (Figura 22), a maior parte (49%) apresentou interação desconhecida. Dentre aquelas com interação conhecida, a maior parte apresentou interações com outras proteínas (22%), como por exemplo, alguns tipos de queratinas, anexinas e cistatinas. As proteínas pertencentes a esse grupo de fato formam camadas de proteínas sucessivas na PA, por interações com outras proteínas adsorvidas na superfície do esmalte dentário. A composição do mineral do esmalte (basicamente hidroxiapatita) influencia diretamente na composição das proteínas que irão se aderir pela alta afinidade com os íons de cálcio e fosfato (8%). São os exemplos de proteínas clássicas desse grupo a estaterina e anidrase carbônica 6, que são proteínas salivares, além de proteínas como *Calcium sensing receptor*, que também tem interações cálcio/fosfato, apesar de nunca descrita anteriormente na PA. Também a *Proline-rich protein 18* nunca foi anteriormente descrita na PA, mas é da mesma família de “precursoras da formação da PA”, por ter uma alta afinidade com o esmalte dentário. O grupo de proteínas com outras interações moleculares (20%)

engloba proteínas que se ligam ao RNA e DNA. São exemplos dessas proteínas a *GTF2IRD2B* e a *RNA-binding protein 34*.

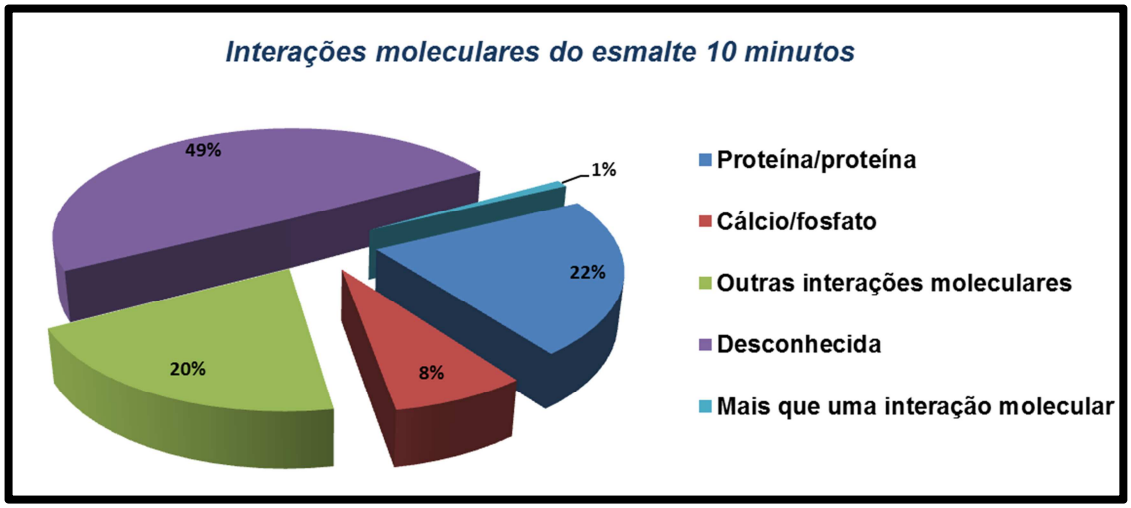


Figura 22 - Distribuição das interações das proteínas identificadas na PA formada sobre o esmalte no período de 10 minutos

Já o perfil dos tipos de interações das proteínas do grupo de esmalte no tempo de 2 horas (Figura 23), mostrou-se um pouco diferente com 33% das proteínas apresentando outras interações moleculares, 25% das proteínas interagindo com outras proteínas e 6% interagindo com cálcio/fosfato, além de 36% das proteínas com interação desconhecida. Observou-se, em relação ao tempo de 10 minutos, uma redução na porcentagem de proteínas que interagem com cálcio-fosfato e um aumento na porcentagem daquelas que interagem com outras proteínas, o que é esperado, devido ao aumento da espessura da PA.

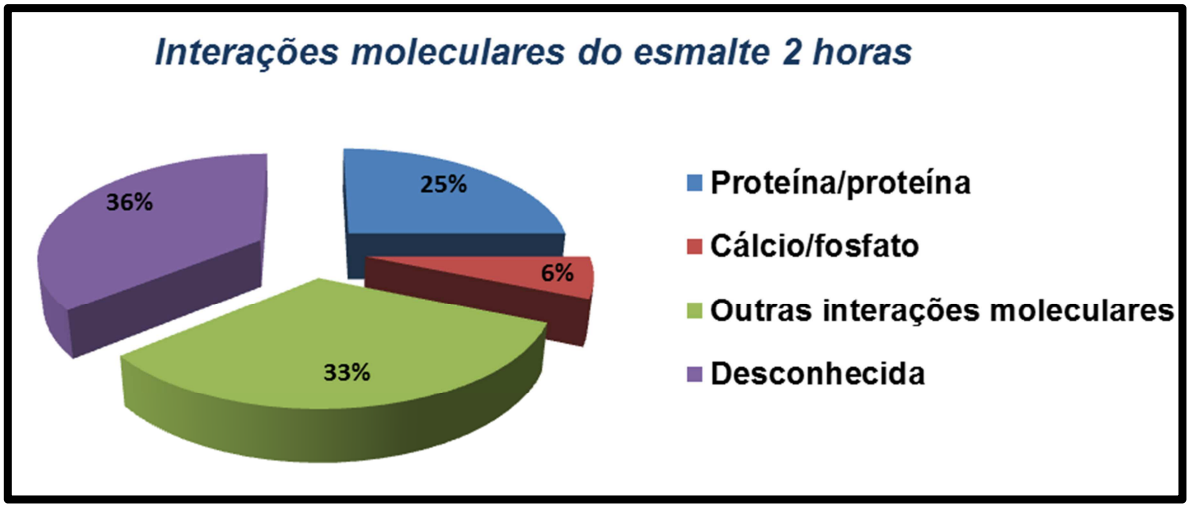


Figura 23 - Distribuição das interações das proteínas identificadas na PA formada sobre o esmalte no período de 2 horas.

O perfil observado para a dentina foi diferente daquele visto para o esmalte. Para o tempo de 10 minutos (Figura 24) de formação da PA, dentre as proteínas com interação conhecida, a maioria (39%) apresentou interação proteína/proteína e apenas 2% apresentou interação com cálcio/fosfato. Isto era esperado, devido ao menor conteúdo mineral e maior conteúdo proteico da dentina (NANCI, 2011). Ainda 15% das proteínas apresentaram outras interações moleculares, 1% mais que uma interação e 43% apresentaram interação desconhecida.

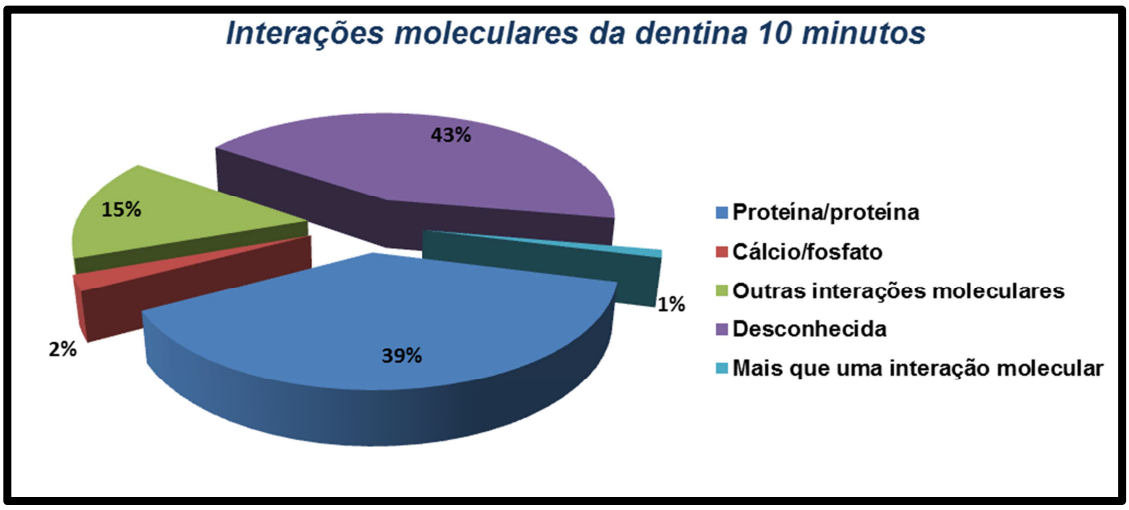


Figura 24 - Distribuição das interações das proteínas identificadas na PA formada sobre a dentina no período de 10 minutos.

Já para o tempo de 2 horas (Figura 25), as proteínas da PA formada sobre a dentina apresentaram uma maior porcentagem de outras interações (27%), além de um aumento na porcentagem de proteínas que interagem com cálcio/fosfato (10%). Este aumento poderia ser explicado porque houve aparecimento de proteínas com que interagem com cálcio/fosfato e que não tinham sido identificadas no tempo de 10 minutos, como anexina, anidrase carbônica e lactoperoxidase. Ainda 9% apresentaram interação com outra proteína e 4% mais de uma interação, enquanto que 50% das proteínas tinham interações desconhecidas.

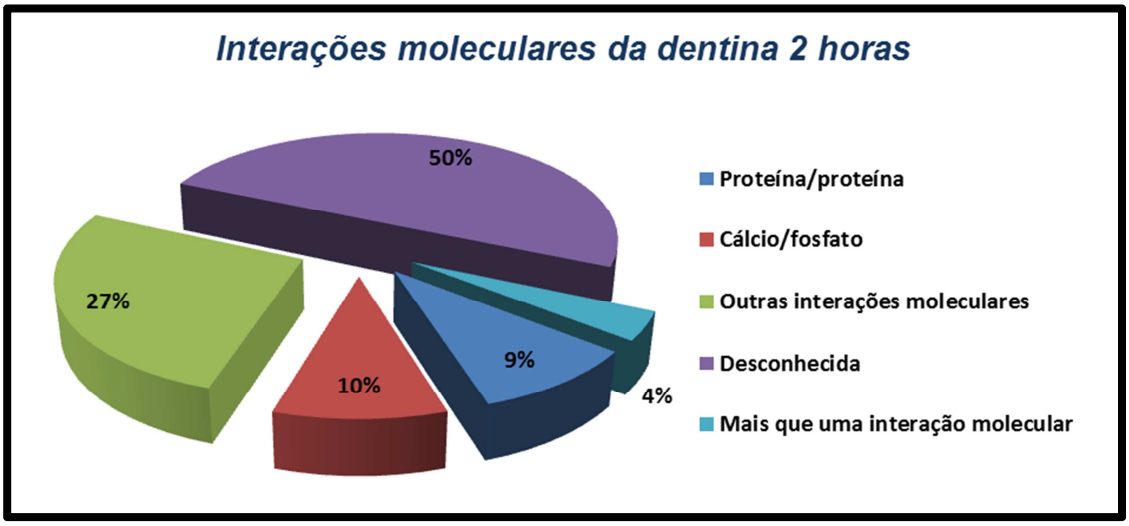


Figura 25 - Distribuição das interações das proteínas identificadas na PA formada sobre a dentina no período de 2 horas.

Muitas das diferentes proteínas identificadas na PA tanto do esmalte quanto da dentina possuem diferentes funções na película, como metabolismo, regeneração de tecidos, antimicrobiana, resposta imune, lubrificação e biomineralização (ZIMMERMAN et al., 2013).

Na PA formada em esmalte, foram identificadas algumas proteínas já descritas com função conhecida, como *Annexin A1,* que é um mediador anti-inflamatório, com afinidade pelo cálcio e que na PA está envolvida com metabolismo, regeneração de tecido, resposta imune e biomineralização (ZIMMERMAN et al., 2013). Também foi identificada a *Cystatin-S*, que na PA apresenta atividade antimicrobiana. Foram identificadas várias isoformas de mucinas, que estão relacionadas com a função de lubrificação. Em adição, a *Mucin-5AC* tem funções de regeneração tecidual, antimicrobiana e biomineralização, por sua afinidade com os íons de cálcio e fosfato. Outro grupo observado foi o das imunoglobulinas. Dentre elas, destaca-se a *Ig alpha-1 chain C region*, que tem função antimicrobiana e de resposta imune. Proteínas envolvidas com a antividade antimicrobiana e resposta imune são necessárias no ambiente bucal para a defesa contra agentes patogênicos (SIQUEIRA et al., 2007b). Foi identificada também a *Statherin,* que confere a lubrificação e biomineralização para esmalte dentário, além da *Carbonic Anhydrase 6*, cuja principal função é a de biomineralização, pela sua alta afinidade pelos íons de cálcio e fosfato. Em adição, estavam presente também

várias isoformas de queratinas e colágeno, que estão relacionados com a função de regeneração de tecido, em ambos os substratos (esmalte e dentina). Outra proteína que foi identificada tanto no esmalte quanto na dentina foi a *Titin,* que nunca tinha sido descrita anteriormente na PA e parece ter habilidade de se ligar ao cálcio, podendo ter uma função na manutenção da homeostase do esmalte dentário, o que precisa ser investigado.

Já na PA formada sobre a dentina, foram identificadas várias proteínas relacionadas com a ligação ao cálcio *(Calcium/calmodulin-dependent 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase 1B, CAMSAP1, MAP6),* além de muitas proteínas associadas à tumorogênese (*KIAA1632, LZTS2, KIAA0649*) e à fosforilação/ desfosforilação de proteínas. Estes achados sugerem que a PA formada sobre a dentina pode ser utilizada como biomarcador para neoplasias, o que precisa ser melhor estudado.

Em adição, muitas das proteínas identificadas tanto na PA do esmalte quanto da dentina não têm a função totalmente conhecida ou ainda não foram caracterizadas. Assim, a sua caracterização poderá trazer novas informações sobre a composição da película, ajudando no entendimento do papel deste integumento na manutenção da homeostasia da cavidade bucal, bem como seu potencial como biomarcador para doenças bucais e sistêmicas.

6 Conclusões

6 CONCLUSÕES

Este estudo foi pioneiro em comparar o perfil proteico de PAs formadas *in situ* sobre o esmalte e a dentina, nos tempos de 10 minutos e 2 horas, utilizando análise proteômica quantitativa livre de marcadores.

O número de proteínas identificadas foi maior para o esmalte que para a dentina e para o tempo de 10 minutos quando comparado com o tempo de 2 horas. Para a PA formada sobre o esmalte, foram identificadas 160 e 64 proteínas, nos tempos de formação de 10 minutos e 2 horas, respectivamente. Os respectivos números de proteínas identificadas para a dentina foram 86 e 52, respectivamente.

Nos tempos de 10 minutos e 2 horas, respectivamente, 25 e 11 proteínas foram comuns a ambos os substratos e foram submetidas à quantificação livre de marcadores, revelando que a maioria das proteínas com diferença de expressão entre os dois substratos teve sua expressão aumentada na dentina.

Foram identificadas ainda, no tempo de 10 minutos de formação da PA, 135 e 61 proteínas exclusivas ao esmalte ou à dentina, respectivamente. O número correspondente de proteínas exclusivas para o tempo de 2 horas foi de 53 e 41 proteínas, para o esmalte e dentina, respectivamente.

Este é o primeiro trabalho a descrever o proteoma da PA formada sobre a dentina. Dentre as proteínas exclusivas da dentina, foram identificadas várias proteínas relacionadas ao complexo cálcio/calmodulina, assim como proteínas associadas à tumorigênese e à fosforilação/desfosforilação de proteínas.

Em adição, muitas das proteínas identificadas no presente estudo, tanto para o esmalte quanto para a dentina, ainda não foram caracterizadas e, portanto, não têm função conhecida na PA. Sua caracterização e estudos funcionais futuros poderão trazer novos horizontes no entendimento da importância da PA para a proteção da estrutura dentária, bem como do papel da PA como sítio de biomarcadores para doenças bucais e sistêmicas.

Em virtude dos resultados obtidos, ambas as hipóteses nulas formuladas foram rejeitadas, uma vez que há diferença considerável na expressão proteica em PAs formadas sobre esmalte e dentina, e o tempo de formação da película altera o perfil de expressão proteica, para ambos os substratos.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

Abbas W, Dichamp I, Herbein G. The HIV-1 Nef protein interacts with two components of the 40S small ribosomal subunit, the RPS10 protein and the 18S rRNA. Virol J. 2012;9:103.

Al-Hashimi I, Levine MJ. Characterization of in vivo salivary-derived enamel pellicle. Arch Oral Biol. 1989;34(4):289-95.

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

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.

Armstrong WG. The composition of organic films formed on human teeth. Caries Res. 1967;1(2):89-103.

Armstrong WG. Origin and nature of the acquired pellicle. Proc R Soc Med. 1968;61(9):923-30.

Attin T, Zirkel C, Hellwig E. Brushing abrasion of eroded dentin after application of sodium fluoride solutions. Caries Res. 1998;32(5):344-50.

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

Cal S, Obaya AJ, Llamazares M, Garabaya C, Quesada V, Lopez-Otin C. Cloning, expression analysis, and structural characterization of seven novel human ADAMTSs, a family of metalloproteinases with disintegrin and thrombospondin-1 domains. Gene. 2002;283(1-2):49-62.

Carpenter GH. The secretion, components, and properties of saliva. Annu Rev Food Sci Technol. 2013;4:267-76.

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

Dawes C, Jenkins GN, Tonge CH (1963). The nomenclature of the integuments of the enamel surface of the teeth. Br Dent J. 1963; 115:65-8.

Deimling D, Breschi L, Hoth-Hannig W, Ruggeri A, Hannig C, Nekrashevych Y, et al. Electron microscopic detection of salivary alpha-amylase in the pellicle formed in situ. Eur J Oral Sci. 2004;112(6):503-9.

Edgar WM. Saliva: its secretion, composition and functions. Br Dent J. 1992;172(8):305-12.

Fabian TK, Hermann P, Beck A, Fejerdy P, Fabian G. Salivary defense proteins: their network and role in innate and acquired oral immunity. Int J Mol Sci. 2012;13(4):4295-320.

Featherstone JD, Lussi A. Understanding the chemistry of dental erosion. Monogr Oral Sci. 2006;20:66-76.

Finke M, Parker DM, Jandt KD. Influence of soft drinks on the thickness and morphology of in situ acquired pellicle layer on enamel. J Colloid Interface Sci. 2002;251(2):263-70.

Gao S, De Geyter C, Kossowska K, Zhang H. FSH stimulates the expression of the ADAMTS-16 protease in mature human ovarian follicles. Mol Hum Reprod. 2007;13(7):465-71.

Gautel M. Cytoskeletal protein kinases: titin and its relations in mechanosensing. Pflugers Arch. 2011;462(1):119-34.

Gerke V, Moss SE. Annexins: from structure to function. Physiol Rev. 2002;82(2):331-71.

Ghaly NR, Roshdy OA, Nassar SA, Hamad SM, El-Shafei AM. Role of mast cells and T-lymphocytes in pemphigus vulgaris: significance of CD44 and the c-kit gene product (CD117). East Mediterr Health J. 2005;11(5-6):1009-17.

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.

Guarnieri V, Valentina D'Elia A, Baorda F, Pazienza V, Benegiamo G, Stanziale P, et al. CASR gene activating mutations in two families with autosomal dominant hypocalcemia. Mol Genet Metab. 2012;107(3):548-52.

Gunbin KV, Ruvinsky A. Evolution of general transcription factors. J Mol Evol. 2012;76(1-2):28-47.

Halama N, Grauling-Halama SA, Beder A, Jager D. Comparative integromics on the breast cancer-associated gene KIAA1632: clues to a cancer antigen domain. Int J Oncol. 2007;31(1):205-10.

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, Attin T, Hannig M, Henze E, Brinkmann K, Zech R. Immobilisation and activity of human alpha-amylase in the acquired enamel pellicle. Arch Oral Biol. 2004;49(6):469-75.

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, 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. Characterisation of lysozyme activity in the in situ pellicle using a fluorimetric assay. Clin Oral Investig. 2009;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, Balz M. Influence of in vivo formed salivary pellicle on enamel erosion. Caries Res. 1999;33(5):372-9.

Hannig M, Balz M. Protective properties of salivary pellicles from two different intraoral sites on enamel erosion. Caries Res. 2001;35(2):142-8.

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.

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. The interaction of human parotid salivary proteins with hydroxyapatite. Arch Oral Biol. 1973;18(12):1517-29.

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.

Hay DI, Moreno EC. Differential adsorption and chemical affinities of proteins for apatitic surfaces. J Dent Res. 1979;58(Spec Issue B):930-42.

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.

Helmerhorst EJ, Oppenheim FG. Saliva: a dynamic proteome. J Dent Res. 2007;86(8):680-93.

Hibino H, Pironkova R, Onwumere O, Vologodskaia M, Hudspeth AJ, Lesage F. RIM binding proteins (RBPs) couple Rab3-interacting molecules (RIMs) to voltage-gated Ca(2+) channels. Neuron. 2002;34(3):411-23.

Imfeld T. Dental erosion. Definition, classification and links. Eur J Oral Sci. 1996;104(2 (Pt 2)):151-5.

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.

Jensen JL, Lamkin MS, Troxler RF, Oppenheim FG. Multiple forms of statherin in human salivary secretions. Arch Oral Biol. 1991;36(7):529-34.

Johnson DT, Luong R, Lee SH, Peng Y, Shaltouki A, Lee JT, et al. Deletion of leucine zipper tumor suppressor 2 (Lzts2) increases susceptibility to tumor development. J Biol Chem
2012;288(6):3727-38.

Klimek J, Hellwig E, Ahrens G. Fluoride taken up by plaque, by the underlying enamel and by clean enamel from three fluoride compounds in vitro. Caries Res. 1982;16(2):156-61.

Knox SM, Whitelock JM. Perlecan: how does one molecule do so many things? Cell Mol Life Sci. 2006;63(21):2435-45.

Lamkin, MS, Arancillo, Oppenheim EG. Temporal and Compositional Characteristics of Salivary Protein Adsorption to Hydroxyapatite. J Dent Res. 1996; 75 (2): 803-8.

Lamkin MS, Jensen JL, Setayesh MR, Troxler RF, Oppenheim FG. Salivary cystatin SA-III, a potential precursor of the acquired enamel pellicle, is phosphorylated at both its amino- and carboxyl-terminal regions. Arch Biochem Biophys. 1991;288(2):664-70.

Lamkin MS, Migliari D, Yao Y, Troxler RF, Oppenheim FG. New in vitro model for the acquired enamel pellicle: pellicles formed from whole saliva show inter-subject consistency in protein composition and proteolytic fragmentation patterns. J Dent Res. 2001;80(1):385-8.

Lamkin MS, Oppenheim FG. Structural features of salivary function. Crit Rev Oral Biol Med. 1993;4(3-4):251-9.

Lee CA, Ismail B, Vickers ZM. The role of salivary proteins in the mechanism of astringency. J Food Sci. 2012;77(4):C381-7.

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.

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

Liu T, Li Y, Gu H, Zhu G, Li J, Cao L, et al. p21-Activated kinase 6 (PAK6) inhibits prostate cancer growth via phosphorylation of androgen receptor and tumorigenic E3 ligase murine double minute-2 (Mdm2). J Biol Chem. 2012;288(5):3359-69.

Lussi A. Dental erosion clinical diagnosis and case history taking. Eur J Oral Sci. 1996;104(2 (Pt 2)):191-8.

Magalhaes AC, Wiegand A, Rios D, Honorio HM, Buzalaf MA. Insights into preventive measures for dental erosion. J Appl Oral Sci. 2009;17(2):75-86.

Marzinke MA, Henderson EM, Yang KS, See AW, Knutson DC, Clagett-Dame M. Calmin expression in embryos and the adult brain, and its regulation by all-trans retinoic acid. Dev Dyn. 2009;239(2):610-9.

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.

Mayhall CW, Butler WT. The carbohydrate composition of experimental salivary pellicles. J Oral Pathol. 1976;5(6):358-70.

McDonald EE, Goldberg HA, Tabbara N, Mendes FM, Siqueira WL. Histatin 1 resists proteolytic degradation when adsorbed to hydroxyapatite. J Dent Res. 2011;90(2):268-72.

Meckel AH. The formation and properties of organic films on teeth. Arch Oral Biol. 1965;10(4):585-98.

Meurman JH, ten Cate JM. Pathogenesis and modifying factors of dental erosion. Eur J Oral Sci. 1996;104(2 (Pt 2)):199-206.

Mimori-Kiyosue Y, Grigoriev I, Lansbergen G, Sasaki H, Matsui C, Severin F, et al. CLASP1 and CLASP2 bind to EB1 and regulate microtubule plus-end dynamics at the cell cortex. J Cell Biol. 2005;168(1):141-53.

Mistry M, Grenby TH. Erosion by soft drinks of rat molar teeth assessed by digital image analysis. Caries Res. 1993;27(1):21-5.

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.

Moss SJ. Dental erosion. Int Dent J. 1998;48(6):529-39.

Nanci A. Ten Cate Histologia Oral: Elsevier Health Sciences Brazil; 2011.

Nasmyth A. On the structure, physiology, and pathology of the persistent capsular investments and pulp of the tooth. Med Chir Trans. 1839;22:310-28.

Neyraud E, Sayd T, Morzel M, Dransfield E. Proteomic analysis of human whole and parotid salivas following stimulation by different tastes. J Proteome Res. 2006;5(9):2474-80.

Oppenheim FG, Xu T, McMillian FM, Levitz SM, Diamond RD, Offner GD, et al. Histatins, a novel family of histidine-rich proteins in human parotid secretion.

Isolation, characterization, primary structure, and fungistatic effects on Candida albicans. J Biol Chem. 1988;263(16):7472-7.

Orstavik D, Kraus FW. The acquired pellicle: enzyme and antibody activities. Scand J Dent Res. 1974;82(3):202-5.

Ostman A, Hellberg C, Bohmer FD. Protein-tyrosine phosphatases and cancer. Nat Rev Cancer. 2006;6(4):307-20.

Otto WB. Estudo *in vivo* do perfil proteico da película dental adquirida após o consumo de bebida a base de soja e leite bovino [tese]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná; 2011.

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

Rølla G, Rykke G. Evidence for presence of micelle-like protein globules in human saliva. Colloids Surf B Biointerfaces. 1994;3:177–182.

Rykke M, Sonju T, Rolla G. Interindividual and longitudinal studies of amino acid composition of pellicle collected in vivo. Scand J Dent Res. 1990;98(2):129-34.

Salvato F, Carvalho MCCG, Leite AL. Strategies for Protein Separation, Integrative Proteomics, Dr. Hon-Chiu Leung (Ed.), ISBN: 978-953-51-0070-6, InTech. Available from: http://www.intechopen.com/books/integrative-proteomics/strategies-for-protein-separation. 2012.

Samora CP, Mogessie B, Conway L, Ross JL, Straube A, McAinsh AD. MAP4 and CLASP1 operate as a safety mechanism to maintain a stable spindle position in mitosis. Nat Cell Biol. 2011;13(9):1040-50.

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.

Santos FZC. Determinação da composição da película adquirida formada sobrehumano in vivo e da sua modificação após estimulação química emecânica do fluxo salivar: estudo proteômico [dissertação]. Bauru: Faculdade de Odontologia de Bauru; 2013.

Saxton CA. Scanning electron microscope study of the formation of dental plaque. Caries Res. 1973;7(2):102-19.

Scarano E, Fiorita A, Picciotti PM, Passali GC, Calo L, Cabras T, et al. Proteomics of saliva: personal experience. Acta Otorhinolaryngol Ital. 2010;30(3):125-30.

Scheutzel P. Etiology of dental erosion--intrinsic factors. Eur J Oral Sci. 1996;104(2 (Pt 2)):178-90.

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, Helmerhorst EJ, Zhang W, Salih E, Oppenheim FG. Acquired enamel pellicle and its potential role in oral diagnostics. Ann N Y Acad Sci. 2007a;1098:504-9.

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, 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. 2007b;6(6):2152-60.

Smith BG, Knight JK. An index for measuring the wear of teeth. Br Dent J. 1984;156(12):435-8.

Song JS, Hwang DH, Kim SO, Jeon M, Choi BJ, Jung HS, et al. Comparative gene expression analysis of the human periodontal ligament in deciduous and permanent teeth. PLoS One. 2013;8(4):e61231.

Sonju T. Investigations of some salivary glycoproteins and their possible role in pellicle formation. Nor Tannlaegeforen Tid. 1975;85(10):393-403.

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.

Suwabe T, Fukami H, Bradley RM. Synaptic responses of neurons controlling the parotid and von Ebner salivary glands in rats to stimulation of the solitary nucleus and tract. J Neurophysiol. 2008;99(3):1267-73.

Svendsen, I. In vitro and in vivo studies of salivary films at solid/liquid interfaces. [tese]. Suécia: Malmö University; 2009.

Taba M, Jr., Kinney J, Kim AS, Giannobile WV. Diagnostic biomarkers for oral and periodontal diseases. Dent Clin North Am. 2005;49(3):551-71, vi.

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

Ten Cate JM, Imfeld T. Dental erosion, summary. Eur J Oral Sci. 1996;104(2 (Pt 2)):241-4.

Turner RJ, Sugiya H. Understanding salivary fluid and protein secretion. Oral Dis. 2002;8(1):3-11.

Turtoi A, Musmeci D, Naccarato AG, Scatena C, Ortenzi V, Kiss R, et al. Sparc-like protein 1 is a new marker of human glioma progression. J Proteome Res. 2012;11(10):5011-21.

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

Vassilakos N, Arnebrant T, Glantz PO. An in vitro study of salivary film formation at solid/liquid interfaces. Scand J Dent Res. 1993;101(3):133-7.

Vassilakos N, Arnebrant T, Rundegren J, Glantz PO. In vitro interactions of anionic and cationic surfactants with salivary fractions on well-defined solid surfaces. Acta Odontol Scand. 1992;50(3):179-88.

Vitorino R, Calheiros-Lobo MJ, Duarte JA, Domingues PM, Amado FM. Peptide profile of human acquired enamel pellicle using MALDI tandem MS. J Sep Sci. 2008;31(3):523-37.

Vitorino R, Calheiros-Lobo MJ, Williams J, Ferrer-Correia AJ, Tomer KB, Duarte JA, et al. Peptidomic analysis of human acquired enamel pellicle. Biomed Chromatogr. 2007;21(11):1107-17.

Vukosavljevic D, Custodio W, Del Bel Cury AA, Siqueira WL. The effect of histatin 5, adsorbed on PMMA and hydroxyapatite, on Candida albicans colonization. Yeast. 2012;29(11):459-66.

Vukosavljevic D, Custodio W, Siqueira WL. Salivary proteins as predictors and controls for oral health. J Cell Commun Signal. 2011;5(4):271-5.

Weiss N, Sandoval A, Kyonaka S, Felix R, Mori Y, De Waard M. Rim1 modulates direct G-protein regulation of Ca(v)2.2 channels. Pflugers Arch. 2011;461(4):447-59.

WenQiang T, Yi G, Yu S, Jung T, DaYe S. Extracellular calmodulin-binding proteins in body fluids of animals. J Endocrinol. 1997;155(1):13-7.

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.

Wolski WE, Lalowski M, Jungblut P, Reinert K. Calibration of mass spectrometric peptide mass fingerprint data without specific external or internal calibrants. BMC Bioinformatics. 2005; 203 (6): 1- 17.

Wong D. Salivary Diagnostics: Wiley; 2009.

Yang L, Zhao J, Lu W, Li Y, Du X, Ning T, et al. KIAA0649, a 1A6/DRIM-interacting protein with the oncogenic potential. Biochem Biophys Res Commun. 2005 ;334 (3):884-90.

Yao Y, Grogan J, Zehnder M, Lendenmann U, Nam B, Wu Z, et al. Compositional analysis of human acquired enamel pellicle by mass spectrometry. Arch Oral Biol. 2001;46(4):293-303.

Yao Y, Lamkin MS, Oppenheim FG. Pellicle precursor protein crosslinking characterization of an adduct between acidic proline-rich protein (PRP-1) and statherin generated by transglutaminase. J Dent Res. 2000;79(4):930-8.

Yoshioka N, Asou H, Hisanaga S, Kawano H. The astrocytic lineage marker calmodulin-regulated spectrin-associated protein 1 (Camsap1): phenotypic heterogeneity of newly born Camsap1-expressing cells in injured mouse brain. J Comp Neurol. 2012;520(6):1301-17.

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

Zeng W, Corcoran C, Collins-Racie LA, Lavallie ER, Morris EA, Flannery CR. Glycosaminoglycan-binding properties and aggrecanase activities of truncated

ADAMTSs: comparative analyses with ADAMTS-5, -9, -16 and -18. Biochim Biophys Acta. 2006;1760(3):517-24.

Zero DT. Etiology of dental erosion--extrinsic factors. Eur J Oral Sci. 1996;104(2 (Pt 2)):162-77.

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 – Termo de aprovação do 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
e-mail: mferrari@fob.usp.br

Processo nº 038/2011

Bauru, 28 de abril de 2011.

Senhora Professora,

O projeto de pesquisa encaminhado a este Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, denominado "**Determinação de composição da película adquirida formada sobre esmalte e dentina através de técnicas proteômicas**", de autoria de Melina Rodrigues Bellini, que será desenvolvido sob sua orientação, foi enviado ao relator para avaliação.

Na reunião de 27 de abril de 2011 o parecer do relator, **aprovando o projeto**, foi aceito pelo Comitê, considerando que não existem infrações éticas pendentes.

Informamos que qualquer alteração efetuada no trabalho de pesquisa, o pesquisador/orientador deverá comunicar ao CEP-FOB/USP, bem como ao final do trabalho enviar um Relatório para novo parecer, o qual será utilizado para publicação científica.

Atenciosamente,

Profª Drª Maria Teresa Atta
Vice-Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
FOB-USP

Prof. Dr. Flávio Augusto Cardoso de Faria
Coordenador

Prof. Dr. Flávio Augusto Cardoso de Faria
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
FOB-USP

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

ANEXO B- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

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 sobre os dentes, em diferentes tempos: 10 minutos e 2 horas. Participarão deste estudo 9 voluntários com idade de 18 a 35 anos, de ambos os gêneros, não fumantes, em bom estado de saúde geral e bucal (sem gengivite, periodontite e nem nenhuma outra condição bucal que possa afetar a composição dos fluidos orais) e que não estejam fazendo uso de medicamentos.

O experimento será realizado em três dias subsequentes, tendo início às 8 horas da manhã, sendo os procedimentos para coleta de película idêntica para ambos os dias (será feito em três dias: para se obter as amostras em triplicata, as amostras serão coletadas individualmente de todos os voluntários para cada substrato e tempo de coleta).

Os voluntários receberão uma meticulosa profilaxia dentária a jato de bicarbonato. Em seguida, os dispositivos mandibulares contendo blocos de esmalte e dentina serão colocados na cavidade bucal para que a película adquirida se forme naturalmente sobre os blocos. A coleta da película será feita aos 10 e 120 minutos de formação de película, sendo coletados 6 blocos de esmalte e 6 blocos de dentina nesses respectivos tempo.

Estes tempos foram selecionados para que se possa comparar a composição protéica da película jovem e mais madura. O tempo máximo de 120 minutos foi escolhido para se evitar a possível agregação bacteriana, que poderia interferir nos resultados. Durante este período, os voluntários serão privados do consumo de alimentos e bebidas.

Em relação aos benefícios oferecidos, 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 moldeira contendo os blocos de esmalte e dentina devidamente esterilizados e todo o tratamento dos mesmos será feito após a remoção da sua boca.

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 esclarecimentos de dúvidas, a qualquer momento, contactar a pesquisadora (Melina Rodrigues Bellini) pelos telefones (14)3235-8246 ou (14) 9704-7152.

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.

_____
Sujeito da Pesquisa

_____
Melina Rodrigues Bellini
Autor

ANEXO C – Termo de doação do Banco de Dentes (FOB/USP)

Banco de Dentes Humanos FOB USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

TERMO DE CESSÃO DE DENTES HUMANOS

Pesquisa: "Determinação de composição da película adquirida formada sobre esmalte e dentina através de técnicas proteômicas"
Pesquisadora: Melina Rodrigues Bellini
Orientadora: Profa Dra Marília Afonso Rabelo Buzalaf
Espécimes /origem: 50 molares permanentes – BDH/FOB-USP

Cumpro com dever de informar que o BDH/FOB-USP cedeu e transferiu na melhor forma de direito, em consonância com a Resolução 196/96 do Ministério da Saúde, ao pesquisador acima identificado os seguintes elementos dentários:

Incisivos	Caninos	Pré-molares	Molares	TOTAL
-	-	-	50	50

Fato posto, a cessão ocorrida em 03/06/2011 deu-se após a apresentação da carta de aprovação do projeto de pesquisa pelo Comitê de Ética em Pesquisas da FOB-USP (Processo nº038/2011).

Bauru, 13 de Agosto de 2013.

Arsenio Sales Peres
Coordenador BDH/FOB-USP
Pelo cedente

Pesquisadora