UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

NATÁLIA MELLO DOS SANTOS

Avaliação do efeito da saliva artificial, humana in vitro e humana in situ nos estudos de erosão do esmalte

BAURU
2020

NATÁLIA MELLO DOS SANTOS

Avaliação do efeito da saliva artificial, humana in vitro e humana in situ nos estudos de erosão do esmalte

Tese constituída por 2 artigos apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutora em Ciências no Programa de Ciências Odontológicas Aplicadas, na área de concentração de Odontopediatria.

Orientadora: Prof[a]. Dr[a]. Daniela Rios Honório

BAURU
2020

Santos, Natália Mello

Avaliação do efeito da saliva artificial, humana in vitro e humana in situ nos estudos de erosão do esmalte / NATÁLIA MELLO DOS SANTOS – Bauru, 2020.

75p. : il. ; 31cm.

Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo

Orientadora: Profa. Dra. Daniela Rios Honório

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: CAAE 49810015.8.0000.5417
Data: 24/11/2020

FOLHA DE APROVAÇÃO

DEDICATÓRIA

Dedico essa tese a todos que me incentivaram, apoiaram e principalmente vivenciaram todo esse período ao meu lado. Aos meus pais Lucas e Elisângela e a minha filha Manuela, essa vitória tambem é de vocês!

A Deus,

Sou imensamente grata. Obrigada por me mostrar que o melhor caminho nem sempre é o mais fácil. E principalmente por me mostrar que seus planos são infinitamente melhores que os meus!

Á minha família,

Meus pais Elisângela e Lucas,

Os meus maiores incentivadores. A realização deste sonho só foi possível porque vocês sempre me apoiaram, se alegraram junto comigo nos momentos de felicidade e me mantiveram em pé nas dificuldades. Obrigada por não me deixarem desistir! Amo vocês!

Minha filha amada Manuela,

Você foi e sempre será o presente mais lindo que Deus me deu! Acompanhou a mamãe durante a última pesquisa laboratorial, supervisionando as clínicas da graduação e enquanto a mamãe atendia várias crianças. Você ainda é tão pequenininha mas já mudou tanta coisa. Você me transformou e ainda transforma, dia a dia numa pessoa muito melhor. Obrigada por me escolher, me sinto a pessoa mais sortuda do mundo. Tudo o que faço é por você e para você. Te prometo sempre o melhor de mim, até o fim!

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À minha professora e orientadora, **Profa. Dra. Daniela Rios Honório,** me sinto honrada pela oportunidade de ter acompanhado o seu trabalho de perto e por todo conhecimento a mim transmitido. Você é completa, na clínica, na pesquisa e na docência. E após o nascimento da Manuela minha admiração aumentou ainda mais, não sei como você da conta de tudo. Sua vida é uma eterna gincana, sem muitos momentos de descanso rsrs. Porém, apesar de toda essa correria você faz absolutamente tudo com excelência. Serei eternamente grata por todas as oportunidades que me ofereceu. Lembrarei sempre com muito carinho de todos os momentos que vivemos durantes esse anos. Com muito carinho, Obrigada!

À minha parceira de doutorado e amiga **Franciny Querobim Ionta**, colega da pós que se transformou em amiga para a vida toda. Sua amizade é um presente, que eu faço questão de cultivar com muito carinho. Obrigada por entrar na minha vida e por toda ajuda. Você sempre foi um exemplo de dedicação e excelênte profissional. Amo você e esse baby que está a caminho. Contem sempre comigo.

À minha amiga **Aline Silva Braga,** ou tia Aíne rsrs. Agradeço a Deus frequentemente pela sua amizade. Você é a pessoa que eu sempre posso contar, aquela que faço questão de ligar para contar as conquistas e tambem minha primeira opção nos momentos angustiantes. Sua presença sempre tornou tudo mais fácil e alegre também rs. Obrigada por toda ajuda sempre. Amo você!

Ao meu amigo **Vinícius Taioqui Pelá,** Vini, ou Vininho. Sua amizade foi um dos melhores presentes que ganhei da pós-graduação. Você é luz, é aquela pessoa que todos gostariam de ter por perto. Obrigada por tudo, por me acalmar nos momentos difíceis e pelos inúmeros momentos de alegria. Amo Você!

Às amigas **Mayara Bringel e Maiara Falzoni,** as Mayaras da minha vida rsrs. Obrigada por estarem sempre dispostas em ajudar, acolher. A amizade de vocês é muito importante para mim. Saudades de todos os bons momentos que vivemos. As tias mais corujas, que mimam a Manu desde a gestação. Amo vocês!

Às queridas alunas de Iniciação Científica que tive o prazer de co-orientar, **Isadora Messias Batista Rosa** e **Larissa Di Bene Kandalaft**, pois sem vocês a realização de desses projetos nunca seria possível. Ao lado de vocês, tudo foi mais leve, laboratório, corte, dureza, moldagens, fluxo, correria com os voluntários, aparelhos, análises, apresentação de trabalho, relatórios... Obrigada pela parceria meninas e pela experiência única, aprendi muito com vocês!

Ao técnico de laboratório da Odontopediatria e amigo (in memoriam), **Evandro José Dionísio**, faço questão de deixar aqui registrado os meus agradecimentos. A sua participação foi essencial para a realização dessas pesquisas. Ainda é difícil acreditar que você se foi. Levarei você sempre em meu coração!

AGRADECIMENTOS

Agradeço também as pessoas que contribuíram direta ou indiretamente para a concretização dessa tese.

À **Faculdade de Odontologia de Bauru** da Universidade de São Paulo, na pessoa de seu Diretor, Prof. Dr. Carlos Ferreira dos Santos. A infraestrutura da FOB é algo incrível e o ensino fornecido é de alta qualidade. Agradeço a essa instituição, por viabilizar minha pós-graduação.

Aos professores do departamento de Odontopediatria da FOB-USP:
Prof.ª Dr.ª Maria Aparecida de Andrade Moreira Machado, Prof.ª Dr.ª Thais Marchini de Oliveira Valleri, Prof. Dr. Thiago Cruvinel da Silva, Prof. Dr. Natalino Lourenço Neto, agradeço pelos ensinamentos transmitidos e pela incrível relação de trabalho que vocês criaram, tornando muito prazeroso o convívio. Minha eterna admiração e gratidão.

Ao **Prof. Dr. Heitor Marques Honório**, agradeço por sempre se mostrar disponível para ajudar, na realização de análises estatísticas em horários imprevistos, ou mesmo no compartilhamento de ideias.

Aos colegas **Camilla Cristina Di Leone, Bianca Tozi Portalupe Bergantin, Fernanda Lyrio Mendonça, Daniela Cusicanqui Mendez, Estefania Ayala Aguirre, Luciana Lourenço Vitor, Paula Karine Jorge, Bianca Zeponi Mello, Mariel Prado Bergamo, Tássia Carina Stafuzza, e Eloá Ambrosio** de pós-graduação, agradeço pela amizade, troca de conhecimento e pela grande oportunidade de aprender e conviver com vocês. Ca, serei eternamente grata por toda ajuda durante a realização dos projetos que compuseram essa tese. Obrigada pelo companheirismo e por toda contribuição. Tenho muito orgulho da pessoa e profissional que você é, meu enorme carinho e consideração por você!

Aos funcionários do departamento de Odontopediatria FOB-USP:
Estela Ferrari e Lilian Rosana Cândida, pela organização da clínica, agendamento de pacientes, disponibilidade e prontidão em ajudar. Obrigada também pela amizade desenvolvida ao longo desses anos. Agradeço também a **Cleonice Selmo**, que mesmo sendo funcionária da Ortodontia, sempre nos ajudou com muita boa vontade. **Alexandre Montilha,** obrigada pela disponibilidade e pela paciência ao me ajudar a resolver burocracias e problemas sempre rapidamente e com boa vontade. **Lourisvalda Celestino**, sempre com um sorriso no rosto, obrigada pela convivência agradável durante esse processo.

Ao departamento de Ciências Biológicas, disciplina de Bioquímica da FOB- USP, em nome da **Prof.ª Dr.ª Marília Afonso Rabelo Buzalaf**, por permitir a utilização dos equipamentos necessários do laboratório para a realização desse estudo. Aos funcionários do laboratório de Bioquímica da FOB-USP, em especial à **Larissa e Telma**, pela disponibilidade e prontidão em ajudar. E a amiga **Talita Ventura,** obrigada por todos os ensinamentos e momentos agradáveis que vivemos.

Aos **pacientes Odontopediátricos** e seus responsáveis, obrigada pela confiança, disposição na realização de fotografias intra-bucais e pelo carinho, contribuindo para o meu crescimento pessoal e profissional.

Aos **voluntários**, sem vocês a realização do protocolo experimental não seria possível. Obrigada por confiarem em meu trabalho e doarem tempo e disposição para realizarem essas pesquisas com tanto zelo.

À **Central de Esterilização ACECIL**, agradeço pela esterilização dos blocos de dentes utilizados neste estudo.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nivel Superior – Brasil (**CAPES**) – Código de Financiamento 001.

À agência financiadora de pesquisa **Cnpq**, agradeço pela concessão de bolsa de doutorado.

À **banca avaliadora**, agradeço aos professores por aceitarem o convite para participar da banca avaliadora dessa tese, e por contribuírem para o enriquecimento da mesma.

Enfim, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, ou que me impulsionaram de alguma forma para conquistar esse título.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

Marthin Luther King

ABSTRACT

Evaluation of the effect of artificial saliva, human in vitro and human in situ on enamel erosion studies

Due to the high prevalence of dental erosion, numerous in vitro and in situ studies have been carried out in search of preventive and therapeutic measures. However, there is still no standardization of all factors involved in these studies, with saliva being one of the main factors. Therefore, two studies were conducted: study/article I - The purpose of this study was to evaluate the preventive effect of mucin on collected human saliva in comparison with human saliva in situ in the inhibition (DES) and re-hardening (RE) of enamel in relation to erosion in its early stages; article II - The aim of this study was to evaluate the effectiveness of different formulations of artificial saliva in erosive dental wear compared to human saliva in situ. In both articles, human saliva in situ was the positive control. The response variable was the loss of surface hardness in article I and profilometry in article II. In article I the bovine enamel blocks were randomized and distributed in three groups: Gsitu, Gvitro and GvitroM. The enamel samples were subjected to three erosive cycles, each of them corresponding to their immersion in saliva Gvitro, GvitroM, Gsitu for two hours and demineralized in vitro by immersion in citric acid (0.65%, pH 3.5) for 1 minute (erosion SMH). For the performance of Gsitu 10 volunteers used a maxillary appliance with enamel blocks in the morning. After the period of use, the applince was removed from the oral cavity and the blocks were subjected in vitro to demineralization (3X). The data were analyzed by ANOVA / Tukey's test. The addition of mucin in human saliva did not enhance the protective effect against demineralization or the re-hardening of the eroded enamel surface. In article II, the blocks were immersed in 7 groups (n = 20): saliva 1 (electrolytes with 2.7 g of mucin), saliva 2 (saliva 1 without mucin - only electrolytes), saliva 3 (electrolytes only), saliva 4 (electrolytes with 2.2 g of mucin) and saliva 5 (electrolytes with 10 g of sodium carboxymethylcellulose), human saliva in situ and deionized water for 2 hours and then in citric acid (0.05M, pH 2.5) for 2 min, this cycle was performed 4x / day for 5 days. The data were analyzed using the Anova and Tukey's test ($p < 0.05$). Human saliva in situ followed by artificial saliva formulations containing electrolytes and mucin (salivas 1 and 4) promoted less erosive wear, while artificial saliva without mucin (saliva 2) and those containing only electrolytes (saliva 3) or electrolytes and carboxymethylcellulose (saliva 5) showed greater loss of enamel.

Keywords: Erosive dental wear. Artificial saliva. Human Saliva. In vitro. In situ.

RESUMO

Avaliação do efeito da saliva artificial, humana in vitro e humana in situ nos estudos de erosão do esmalte

Devido a alta prevalência de erosão dentária inúmeros estudos in vitro e in situ têm sido realizados em busca de medidas preventivas e terapêuticas. Porém, ainda não há uma padronização de todos os fatores envolvidos nessas pesquisas, sendo a saliva um dos principais fatores. Desta forma duas pesquisas foram desenvolvidas: pesquisa/artigo I - O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito preventivo da mucina na saliva humana coletada em comparação com a saliva humana in situ na inibição (DES) e re endurecimento (RE) do esmalte em relação à erosão em seus estágios iniciais; pesquisa/artigo II - O objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia de diferentes formulações de saliva artificial no desgaste dentário erosivo em comparação com a saliva humana in situ. Nos dois artigos a saliva humana in situ foi o controle positivo. A variável de resposta foi o percentual de perda de dureza no artigo I e perfilometria no artigo II. No artigo I os espécimes de esmalte bovino foram aleatorizados e distrubuidos em três grupos: Gsitu, Gvitro e GvitroM. As amostras de esmalte foram submetidas a três ciclos erosivos, cada ciclo correspondendo à sua imersão na saliva Gvitro, GvitroM, Gsitu por duas horas e desmineralizados in vitro por imersão em ácido cítrico (0,65%, pH 3,5) por 1 minuto (erosão SMH). Para a realização do Gsitu 10 voluntários utilizaram um aparelho palatino com os blocos de esmalte pela manhã. Após o período de uso, o aparelho foi retirado da cavidade oral e os blocos submetidos à desmineralização (3x). Os dados foram analisados por ANOVA/ teste de Tukey. O acréscimo de mucina na saliva humana não potencializou o efeito protetor contra a desmineralização e nem o re endurecimento da superfície de esmalte erodido. No artigo II, os blocos de esmalte bovino foram distribuídos e imersos em 7 grupos (n = 20): saliva 1 (eletrólitos com 2,7 g de mucina), saliva 2 (saliva 1 sem mucina - somente eletrólitos), saliva 3 (somente eletrólitos), saliva 4 (eletrólitos com 2,2 g de mucina) e saliva 5 (eletrólitos com 10 g de carboximetilcelulose de sódio), saliva humana in situ e água deionizada por 2 horas e, em seguida, em ácido cítrico (0,05M, pH 2,5) por 2 min, este ciclo foi realizado 4x / dia por 5 dias. Os dados foram analisados pelo teste de Anova e Tukey ($p < 0,05$). A saliva humana in situ seguida de formulações artificiais de saliva contendo eletrólitos e mucina (salivas 1 e 4) promoveu menor desgaste erosivo, enquanto a saliva artificial sem mucina (saliva 2) e as que contêm apenas eletrólitos (saliva 3) ou eletrólitos e carboximetilcelulose (saliva 5) apresentou maior perda de esmalte.

Palavras-chave: Desgaste dentário erosivo. Saliva artificial. Saliva Humana. In vitro. In situ. Esmalte dentário.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 13

2 ARTIGOS 19

2.1 Artigo 1 – Qual impacto na proteção e re-endurecimento do esmalte quando a saliva humana é utilizada in vitro com adição de mucina? 21

2.2 Artigo 2– Existe uma saliva artificial adequada para simular o efeito da saliva humana nos estudos de desgaste erosivo do esmalte? 35

3 DISCUSSÃO 53

3.1 Metodologia 53

3.2 Resultados 56

4 CONCLUSÕES 63

REFERÊNCIAS 67

ANEXOS 71

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A erosão dentária é uma condição clinicamente definida como o resultado físico de uma perda progressiva e crônica de tecido dental duro causada por um processo químico influenciado por ácidos intrínsecos ou extrínsecos, sem o envolvimento de bactérias (TEN CATE; IMFELD, 1996; LINNETT; SEOW, 2001; GANSS, 2006; SCHLUETER et al., 2020). No estágio inicial do processo erosivo, denominado erosão, há apenas uma desmineralização superficial sem perda de estrutura, que por sua vez é passível de remineralização (AMAECHI; HIGHAM, 2001; AMAECHI; HIGHAM, 2005; SCHLUETER et al., 2020). Enquanto que o processo subsequente de perda de estrutura dentária induzido pelo desafio erosivo prolongado com repetidos eventos de amolecimento combinados aos fatores mecânicos (abrasão e atrição) corresponde ao desgaste dentário erosivo (HUYSMANS; CHEW; ELLWOOD, 2011; SHELLIS et al., 2011; SCHLUETER et al., 2020).

A taxa e gravidade do resultado do desgaste erosivo resultam da interação entre vários fatores comportamentais (aspectos relacionados aos hábitos dietéticos e práticas de higiene bucal), químicos (características do agente erosivo) e biológicos (características bucais do indivíduo) (LUSSI; CARVALHO, 2014; MAGALHÃES et al., 2009, HUYSMANS; CHEW; ELLWOOD, 2011) que ajudam a explicar por que alguns indivíduos apresentam mais erosão do que outros, mesmo quando expostos aos mesmos desafios erosivos em suas dietas (LUSSI; JAEGGI, 2008).

Dentre os fatores biológicos, considera-se que a saliva é o fator com maior potencial para modificar a progressão da erosão dentária (HARA; ZERO, 2014; HANNIG; HANNIG, 2014). A saliva apresenta capacidade tampão de neutralizar ácidos, sendo reconhecida por ser um agente de diluição cuja ação de lavagem remove gradualmente o conteúdo ácido da cavidade bucal através do processo de deglutição. Além disso, o conteúdo inorgânico da saliva é supersaturado em relação ao conteúdo mineral do dente, fornecendo íons cálcio, fosfato e fluoreto necessários para a redeposição mineral (BUFALAF; HANNAS; KATO, 2012; SIQUEIRA et al., 2007; HARA; ZERO, 2014). A sua porção orgânica contém uma gama de proteínas, glicoproteínas e macromoléculas que quando adsorvidas na superfície do esmalte, constituem a película adquirida (HANNIG, BALZ 2001; DODDS; JOHNSON; YEH, 2005; HANNIG; HANNIG, 2014). Em razão de sua permeabilidade seletiva, a película adquirida

restringe a difusão de íons para dentro e fora da superfície do esmalte (ZAHRADNIK et al., 1976, 1977; SLOMIANY et al., 1986, 1990), reduzindo a desmineralização (HANNIG et al., 2003, 2004; HARA et al., 2006; HARA; ZERO, 2014; HANNIG; HANNIG, 2014).

A saliva é naturalmente secretada por três pares de glândulas maiores (parótida, submandibular, sublingual) e inúmeras glândulas salivares menores (SREEBNY, 2000) havendo diferenças quantitativas e qualitativas das secreções provenientes de diferentes glândulas (HANNIG; BALZ, 2001). Por esse motivo, a película adquirida é caracterizada por ter composição, espessura e aparência ultra-estrutural específicas para cada região da cavidade bucal (HANNIG et al., 1997, 1999; CARLÉN et al., 1998; AMAECHI et al., 1999). A composição da película adquirida afeta o seu potencial de transporte iônico e o controle da cristalização de íons cálcio e fosfato (HANNIG; JOINER, 2006). Além disso, a sua espessura parece influenciar também no seu efeito protetor, uma vez que diferenças oriundas, por exemplo, do contato frequente da língua nas superfícies palatais dos dentes superiores tende a reduzir a espessura da película, e, por conseguinte, tornar estas superfícies mais susceptíveis à erosão (AMAECHI et al., 1999). Contudo, a formação da película é um processo relativamente rápido e a sua espessura máxima é atingida após aproximadamente 30 a 60 minutos (LAMKIN; ARANCILLO; OPPENHEIM, 1996; LENDENMANN; GROGAN; OPPENHEIM, 2000), quando não considerados fatores externos capazes de removê-la.

Em situações *in vivo*, o dano provocado pelo ataque ácido ao esmalte ocorre mais lentamente do que nas erosões *in vitro* e *in situ* (HALL et al., 1999), envolvendo processos repetidos de desmineralização/remineralização juntamente com os efeitos da atrição e abrasão sobre a superfície do esmalte (ADDY; SHELLIS, 2014). Portanto, o monitoramento clínico de erosão dentária requer uma avaliação sistemática e, de preferência, quantitativa dos tecidos dentais durante longos períodos de tempo, o que é inviável. Além disso a detecção de pequenas alterações no esmalte *in vivo* é um desafio, visto que a maioria das ferramentas de análise restringe-se as análises *in vitro* (GANSS; LUSSI; KLIMEK, 2005;ARENDS; BOSCH, 1992; BREVIK; LUSSI; RAKHMATULLINA; 2013).

Por esse motivo, as evidências científicas que existem acerca de estratégias para prevenção e controle da erosão dentária fundamentam-se em modelos *in vitro* (HUYSMANS et al., 2014; BUZALAF et al., 2014); e *in situ* (HUYSMANS et al., 2011; REN et al., 2011; KATO; BUZALAF, 2012; JAGER et al., 2013; STENHAGEN et al., 2013; MORETTO et al., 2013). Embora haja consenso de que os estudos *in situ* mimetizam melhor a realidade clínica

para obtenção de informações científicas (ZERO, 1996; WEST; DAVIES; AMAECHI, 2011), as investigações sobre a eficácia de novas terapias normalmente partem de protocolos *in vitro*, frente às vantagens relativas ao baixo custo e execução ao longo de curtos períodos de tempo, exigência de um número reduzido de recurso humano para sua execução em relação aos estudos *in situ*, os quais requerem a conformidade de voluntários dispostos a seguir o protocolo estabelecido pelo estudo (WEST, DAVIES, AMAECHI, 2011).

Contudo, a erosão *in vitro* dificilmente concorda quantitativamente com a erosão *in situ*, uma vez que os efeitos protetores naturais da cavidade bucal estão ausentes (WEST, DAVIES, AMAECHI, 2011). Assim sendo, diante das dificuldades do emprego de saliva natural em estudos *in vitro*, reconhecido pelo longo período requerido para sua coleta e a rápida decomposição (SCHIPPER; SILLETTI; VINGERHOEDS, 2007) formulações substitutivas podem ser utilizadas (IONTA et al., 2014). No entanto, a maioria das formulações não contém proteínas, o que inviabiliza a formação de película adquirida, que apresenta importante impacto no processo erosivo (BUZALAF; HANNAS; KATO, 2012).

Em recente estudo desenvolvido pelo presente grupo de pesquisa, cinco diferentes formulações de saliva artificial foram avaliadas com relação ao potencial remineralizador de lesões de erosão inicial (IONTA et al., 2014). Quando uma mesma formulação de saliva contendo ou não mucina foi avaliada, constatou-se não haver diferença em relação ao poder de remineralização, de modo que os autores sugeriram que a mucina provavelmente estaria relacionada ao efeito protetor contra a desmineralização (IONTA et al., 2014).

As mucinas são glicoproteínas e representam o principal componente orgânico da saliva submandibular e sublingual. Seu elevado grau de glicolisação e potencial para hidratação previnem o ressecamento, enquanto as suas propriedades viscoelásticas proporcionam a lubrificação dos tecidos (BUZALAF; HANNAS; KATO, 2012). Deste modo, as mucinas salivares contribuem em grande parte com o efeito protetor da película adquirida contra a erosão de esmalte (NIEUW AMERONGEN; ODERKERK; DRIESSEN, 1987). Todavia, o possível efeito protetor da mucina contida em salivas artificiais contra a desmineralização do esmalte não é descrita na literatura.

Os estudos que consideram a formação de película salivar *in vitro* utilizam o pool de saliva humana (NEKRASHEVYCH; STOSSER, 2003; NEKRASHEVYCH; HANNIG, STOSSER, 2004; CHEAIB; LUSSI, 2011; LUSSI et al., 2012; BREVIK; LUSSI;

RAKHMATULLINA, 2013), que corresponde ao agrupamento da saliva coletada de diversos doadores que passa por um processo de centrifugação e cuja porção sobrenadante resultante é utilizada para imersão das amostras de esmalte, sobre as quais forma-se película adquirida. No entanto, Nieuw Amerongen; Oderkerk; Driessen (1987) demonstraram que o processo de centrifugação requerido pela técnica remove as mucinas da saliva humana, o que reduz o potencial de proteção da película *in vitro* em até 70%. Diante de tal constatação e na tentativa de minimizar as limitações que norteiam a formação *in vitro* da película adquirida este estudo sugere a avaliação da viabilidade do acréscimo de mucina ao pool de saliva após a centrifugação como uma estratégia para potencializar o efeito protetor contra a desmineralização erosiva do esmalte.

Desta forma, considerando a importância do tema e a escassez de trabalhos que objetivem esclarecer aspectos relativos aos protocolos *in situ* e *in vitro* para o estudo da erosão dentária, este trabalho propõe-se a ampliar o conhecimento acerca do efeito de formulações de saliva artificial, com e sem mucina, da saliva humana *in situ*, bem como do uso da saliva humana in vitro sobre a remineralização, desmineralização e na ocorrência simultânea desses eventos durante a ciclagem erosiva em protocolos *in situ* e *in vitro*.

2 ARTIGOS

2 ARTIGOS

Os artigos apresentados nesta tese foram escritos de acordo com as instruções e diretrizes para a submissão de artigos dos periódicos correspondentes.

- ✓ ARTIGO 1 - Qual impacto na proteção e re-endurecimento do esmalte quando a saliva humana é utilizada in vitro com adição de mucina?

- ✓ ARTIGO 2 - Existe uma saliva artificial adequada para simular o efeito da saliva humana nos estudos de desgaste erosivo do esmalte? Clinical Oral Investigations. (Submetido)

2.1 ARTIGO 1 – Qual impacto na proteção e re-endurecimento do esmalte quando a saliva humana é utilizada in vitro com adição de mucina?

Resumo

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito preventivo da mucina na saliva humana coletada em comparação com a saliva humana in situ na inibição (DES) e re endurecimento (RE) do esmlate em relação à erosão em seus estágios iniciais. As amostras de esmalte bovino foram selecionadas e aleatorizadas a partir da dureza superficial inicial em três grupos (n = 23): Gsitu (saliva humana in situ, controle positivo); Gvitro (saliva humana coletada, efeito in vitro) e GvitroM (saliva humana coletada, efeito in vitro com mucina). As amostras de esmalte foram submetidas a um ciclo erosivo, correspondendo à sua imersão na saliva Gvitro e GvitroM por duas horas e desmineralizados in vitro por imersão em ácido cítrico (0,65%, pH 3,5) por 1 minuto (erosão SMH). Foram realizados três ciclos erosivos. Para a realização do Gsitu 10 voluntários utilizaram um aparelho palatino com os blocos de esmalte pela manhã. Após o período de uso, o aparelho foi retirado da cavidade oral para retirada dos blocos e posterior desmineralização. Essa ciclagem erosiva se repetiu três vezes. Ao final do experimento, todos os blocos foram submetidos ao efeito da saliva em seus respectivos grupos por 2 horas. A medição da dureza foi realizada após cada imersão (saliva e ácido). Foram analisadas as porcentagens de perda de dureza e de recuperação de dureza (ANOVA/ teste de Tukey). A perda de dureza foi variável entre os grupos e os ciclos sendo os valores na 1ª ciclagem Gvitro (44.35±6.11) = GvitroM (44.29±4.68) > Gsitu (29.84±4.78), na 2ª ciclagem Gsitu (24.94±8.72) > Gvitro (5.99±6.27) = GvitroM (-3.24±9.57) e na 3ª ciclagem Gsitu (18.42±10.19) = Gvitro (23.38±7.70) = GvitroM (19.47±7.13). As salivas apresentaram percentuais de recuperação de dureza semelhantes em todas as ciclagens, sendo na 1ª ciclagem Gsitu (35.95±17.49), Gvitro (42.22±15.60), GvitroM (45.09±15.56), na 2ª ciclagem Gsitu (25.39±10.18), Gvitro (23.08±20.26), GvitroM (22.49±13.70) e na 3ª ciclagem Gsitu (15.57±11.75), Gvitro (12.89±7.72), GvitroM (15.99±4.01), com diminuição dos valores a cada ciclagem. O acréscimo de mucina na saliva humana não potencializou o efeito protetor contra a desmineralização e nem o re endurecimento da superfície de esmalte erodida.

Palavras-chave: Desgaste dentário erosivo. Saliva. In vitro. In situ.

Introdução

A saliva é a principal responsável pela homeostase no meio bucal (Dawes, 2008). Muitas alterações pós-eruptivas que afetam o esmalte dentário resultam do desequilíbrio entre os fatores agressivos e o efeito protetor da saliva (Dawes, 2008). Uma dessas alterações que merece atenção devido às suas consequências é o desgaste dentário erosivo (Lussi; Carvalho, 2014). Ácidos extrínsecos e intrínsecos de origem não bacteriana podem entrar em contato com o esmalte causando desmineralização superficial sem perda de estrutura chamada erosão dentária (Lussi; Ccarvalho, 2014). Nesta fase, a desmineralização pode ser prevenida ou diminuída por diluição ácida, tamponamento ou supersaturação de íons (cálcio, fosfato e flúor) pela saliva (Hara; Zero, 2014). Além disso, a presença de película adquirida do esmalte pode atuar como barreira semipermeável, diminuindo o contato direto do ácido com o dente (Buzalaf; Hannas; Kato, 2012; Hannig; Hannig, 2014). Em um estágio seguinte, o desafio ácido prolongado com eventos repetidos de amolecimento combinado com forças mecânicas orais pode resultar na perda da estrutura dentária, correspondendo ao desgaste dentário erosivo (DDE) (Lussi; Carvalho, 2014; Schlueter et al., 2020). Novamente, a saliva pode neutralizar o impacto ácido e mecânico, fornecendo íons cálcio, fosfato e fluoreto necessários para a redeposição mineral e pela lubrificação do esmalte resultante da presença de película adquirida do esmalte (Buzalaf; Hannas; Kato, 2012; Siqueira et al., 2007). A saliva influencia diretamente o desgaste dentário erosivo, sendo considerada o fator de proteção natural mais importante em sua etiologia multifatorial (Hara; Zero, 2014).

Atualmente, a mudança no estilo de vida e nos hábitos alimentares tem levado a uma alta prevalência de desgaste dentário erosivo (Schlueter; Tveit, 2014). Os resultados de uma revisão sistemática com meta análise estimaram que a prevalência de desgaste dentário erosivo em dentes permanentes de crianças e adolescentes está em torno de 30% (Salas et al., 2015). Este cenário preocupa e intensifica a demanda por estratégias de controle e prevenção do desgaste dentário erosivo.

Ensaios clínicos randomizados bem delineados são considerados o tipo de estudo padrão-ouro com o objetivo de responder questões sobre tratamento e prevenção de doenças. Infelizmente, há dificuldade em realizar este tipo de estudo em erosão dentária pois não existe nenhuma alternativa validada para avaliação quantitativa dos tecidos dentais ao longo do tempo [Ganss et al., 2005; Arends; Bosch, 1992; Brevik et al., 2013]. Embora medições perfilométricas de moldes com software para alinhar e analisar alterações de desgaste tenham sido utilizadas em pesquisas, elas mostram algumas limitações [Ganss, Lussi., 2014; Alaraudanjoki et al., 2017, Marro et al., 2018; O'Toole et al., 2019, Marro et al., 2020]. Além

disso, os scanners intra-orais são instrumentos promissores a serem potencialmente usados para o diagnóstico clínico e monitoramento do DDE [Ganss, Lussi., 2014; Alaraudanjoki et al., 2017, Marro et al., 2018]. No entanto, essas alternativas ainda não são uma realidade para o uso clínico. Portanto, a maior parte das evidências sobre estratégias de prevenção e controle da erosão dentária são provenientes de estudos in vitro e in situ (West et al., 2011; Huysmans et al., 2011; Huysmans et al., 2014; Buzalaf et al., 2014). No entanto, ambos não são capazes de imitar o ambiente oral com todas as variações biológicas conhecidas por influenciar o desgaste dentário erosivo (West et al., 2011). Os modelos in vitro são adequados para os estágios iniciais de teste de hipóteses ou desenvolvimento de produtos, pois permitem estudar fatores experimentais isolados em um tempo de experimento relativamente curto, com baixo custo operacional, não dependendo da adesão do participante e requerem poucos voluntários [Hara et al., 2008 ; West et al., 2011]. Sua principal limitação é a impossibilidade de exposição dos espécimes ao meio oral e saliva. A fim de superar essa restrição, alguns estudos usam saliva humana coletada, entre desafios erosivos. No entanto, a coleta e o armazenamento podem alterar o efeito salivar devido à degradação das proteínas. As mucinas são componentes importantes da saliva e da película adquirida do esmalte [Nieuw Amerongen et al., 1987]. Nieuw Amerongen et al. [1987] descobriram que quando a saliva submandibular/sublingual estava depletada de mucinas, a proteção da película adquirida do esmalte contra a desmineralização pelo ácido cítrico diminuiu 70% [Nieuw Amerongen et al., 1987]. A mucina pode estar envolvida no efeito protetor salivar. Esta proteína foi adicionada à saliva artificial, mas não foi testada anteriormente quando adicionada à saliva humana coletada. Nesse sentido, o presente estudo visa investigar o impacto do uso de pool de saliva humana com e sem mucina in vitro na inibição da desmineralização erosiva e no endurecimento do esmalte quando comparado ao efeito da saliva in situ.

Material e métodos

Design Experimental

Blocos de esmalte bovino foram selecionados pela dureza superficial inicial (SMH inicial) e distribuídos aleatoriamente em três grupos (grupo n = 23 pr): Gsitu (saliva humana in situ, controle positivo); Gvitro (saliva humana coletada, efeito in vitro) e GvitroM (saliva humana coletada, efeito in vitro com mucina). Um tamanho de amostra de 18 blocos por grupo foi estimado com base em um erro Tipo I (α) de 5%, erro Tipo II (β) de 20%, 10% de endurecimento do esmalte como a diferença mínima detectável nas médias e 7,35% µm como o desvio padrão estimado (Moretto et al. 2014). Cinco blocos adicionais foram usados no caso

de perdas eventuais, totalizando 69 espécimes. Após mensuração da dureza superficial inicial, os blocos foram submetidos a três ciclos erosivos, cada um correspondendo à imersão na saliva em estudo por duas horas e desmineralizados in vitro por imersão em ácido cítrico (0,65%, pH 3,5) por 1 minuto (erosão SMH). Após o último dos três ciclos, os blocos foram imersos na saliva estudada por 2 horas. A medição da dureza foi realizada após cada imersão (saliva e ácido). A variável de resposta foi a porcentagem de perda de dureza.

Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Local (protocolo nº 49810015.8.0000.5417). Este estudo foi realizado em total conformidade com a Declaração de Helsinque. O consentimento informado por escrito foi obtido de cada voluntário no início do estudo, antes da confirmação de sua elegibilidade para o estudo.

Preparo de amostras de esmalte

Blocos de esmalte (4x4x3 mm, n = 110) foram preparados a partir das superfícies vestibulares de coroas de incisivos bovinos. Os blocos foram cortados com cortadeira de baixa velocidade ISOMET (Buehler Ltd., Lake Bluff, IL, EUA) com dois discos de diamante (Extec Corp., Enfield, CT, EUA), os quais foram separados por um espaçador de 4 mm de espessura. As superfícies dos blocos foram polidas com discos de carboneto de silício resfriados a água (papéis de grau 600 e 1200; Buehler, Lake Bluff, IL, EUA) e polidas com papel de feltro umedecido por spray de diamante de 1 µm (Buehler, Ltd., Lake Bluff, IL, EUA). Os blocos foram limpos em aparelho de ultrassom por 10 min e inicialmente selecionados de acordo com a ausência de manchas brancas e trincas em microscópio (x40). As amostras foram esterilizadas com óxido de etileno.

A dureza superficial do esmalte foi avaliada usando um microdurômetro (Buehler, US) com um penetrador de diamante piramidal tipo Knoop. Primeiramente, foi feita uma grande marcação com carga de 500g por 10 segundos, para referência. Em seguida, a 200 µm de distância dessa marcação, foram realizadas cinco indentações com carga de 25 g por 10 segundos com uma distância de 100 µm entre elas. O valor da dureza superficial inicial (SHi) correspondeu à média dessas cinco indentações. Sessenta e nove blocos foram selecionados de acordo com os valores iniciais de dureza superficial (valor médio de SHi = 358,71 ± 30,07 KHN).

Coleta de saliva

Dez voluntários adultos saudáveis (com idades entre 19-30 anos) residentes na mesma área fluoretada (0,70 mg F / l) participaram do estudo, após satisfazer os seguintes critérios de inclusão: taxa de fluxo salivar estimulado fisiológico (> 1ml / min) e taxa de fluxo salivar não-

estimulado fisiológico (> 0,25 ml / min), saúde bucal adequada sem lesões de cárie, lesões por erosão ou gengivite / periodontite significativa. Os critérios de exclusão foram doença sistêmica, gravidez ou amamentação, sob intervenção ortodôntica e uso profissional de compostos fluoretados nos últimos dois meses.

Amostras de saliva estimulada de todos os voluntários foram coletadas em frascos resfriados com gelo. A quantidade de saliva fornecida pelos voluntários foi coletada de acordo com o número de blocos presentes no aparelho intrabucal, de forma que cada voluntário forneceu um total de 30 ml, exceto para 3 voluntários que tiveram mais de dois blocos e forneceram 45 ml. Imediatamente após a coleta, a saliva foi centrifugada a 4000 rpm / 6 ° C por 15 min (Brevik, Lussi, Rakhmatullina, 2013). Na saliva humana com mucina, foi obtida a saliva e após centrifugação, foram adicionados 2,7 g de mucina por litro de solução à sua porção sobrenadante.

Para o efeito in situ da saliva, foi confeccionado para cada voluntário um dispositivo palatino removível com resina acrílica no modelo de gesso. O dispositivo palatino apresentava duas fileiras verticais, uma à direita e outra à esquerda, com uma cavidade (6x6x3 mm) de cada lado, para fixação dos blocos de esmalte (dois blocos por aparelho). Apenas 3 voluntários tinham 3 blocos em seu dispositivo. Os blocos de esmalte foram fixados nos dispositivos com cera. Um fio ortodôntico foi preso às extremidades da cavidade passando sobre os blocos de esmalte sem tocá-los, para evitar a abrasão do esmalte pela língua ou mucosa oral.

Ciclagem erosiva

Imediatamente após a coleta da saliva e centrifugação, os blocos foram colocados em Eppendorf individual numerado de acordo com o grupo / número do bloco e imersos em um volume de 1,8 ml de saliva, por um período de 2 horas, conforme grupo de estudo (Gvitro – saliva humana in vitro; GvitroM - saliva humana in vitro com 2,7g de mucina / 1000 ml).

Para o grupo de saliva humana in situ (Gsitu) os voluntários utilizaram (1ª, 2ª e 3ª ciclagem erosiva) o dispositivo intraoral por um período de 2 horas. O dispositivo foi utilizado pela manhã, por todos os voluntários. Após o período de uso, o dispositivo foi retirado da cavidade oral para retirada dos blocos.

Em seguida, a lesão erosiva foi realizada in vitro por imersão dos blocos em solução de ácido cítrico 0,65% (Sigma-Aldrich, Alemanha), pH 3,5, por 1 minuto, sob agitação constante. Para isso, cada bloco foi colocado no Eppendorf numerado de acordo com o grupo e o número do bloco, sendo então dispensado o volume de 1,8 ml de solução de ácido cítrico. Os blocos foram retirados e lavados com água deionizada por dois minutos para interromper o processo de desmineralização.

A ciclagem erosiva foi repetida mais 2 vezes, totalizando 3 ciclos. Ao final do experimento, todos os blocos foram submetidos ao efeito da saliva em seus respectivos grupos por 2 horas.

Porcentagem de perda e recuperação de dureza superficial

A dureza superficial foi medida inicialmente para seleção e randomização e após cada ciclo em dois momentos, após imersão na saliva e após a erosão. Foi dada uma distância de 100 μm na horizontal em relação às indentações anteriores e foram feitas 5 novas indentações, com uma distância de 100 μm entre elas na direção vertical. A porcentagem de recuperação de dureza (% HR) ou perda de dureza (% HL) foi calculada após cada ciclo erosivo de acordo com as seguintes fórmulas:% HR = [(dureza após redeposição RE - dureza após erosão DES) / (Durez

a inicial - dureza após erosão DES)] X 100; % HL = [(dureza inicial - dureza após erosão DES) / (dureza inicial)] X 100. É importante enfatizar que haverá 3 valores de dureza após a redeposição RE e 3 de dureza após a erosão DES correspondendo à dureza após endurecimento e erosão em cada um dos 3 ciclos; entretanto a dureza inicial será a imediatamente anterior ao ciclo. Por exemplo, a dureza inicial para% HL da segunda ciclagem erosiva corresponde ao valor da dureza após o redeposição do ciclo 1. Por outro lado, a primeira dureza corresponde ao valor do esmalte íntegro usado para randomização.

Análise estatística

A análise estatística foi realizada com SigmaPlot versão 12.3 (2011 Systat Software, Alemanha) seguindo as recomendações para pesquisas odontológicas. As análises de recuperação de dureza (% HR) e perda de dureza (% HL) foram realizadas separadamente para dois critérios, tipo de saliva e evolução da ciclagem erosiva. Portanto, foram aplicados a Análise de Variância de Medidas Repetidas dois critérios e o teste post hoc de Tukey. O nível de significância foi estabelecido em 5%.

Resultados

A Tabela 1 mostra os valores médios de dureza do esmalte antes e depois de cada erosão (ED) e evento de recuperação de dureza das 3 ciclagens erosivas. Ao considerar o percentual de perda de dureza (Tabela 2), foi encontrada diferença estatística para o tipo de saliva (α = 0,000), para a evolução da ciclagem erosiva (α = 0,000) e sua interação (α = 0,000). A primeira desmineralização erosiva resultou em maior perda de esmalte para os grupos de saliva in vitro, sem diferença entre com e sem mucina. Após a segunda desmineralização erosiva o esmalte previamente imerso em saliva in vitro com mucina não apresentou mineralização, diferentemente dos imersos em saliva in vitro sem mucina. O esmalte submetido à saliva in situ

apresentou a maior perda de esmalte. Os tipos de saliva estudados promoveram perdas semelhantes de dureza do esmalte após a terceira desmineralização erosiva. Na primeira desmineralização foi observada maior porcentagem de perda de esmalte para as salivas estudadas in vitro em relação à segunda e terceira desmineralização. O efeito da saliva in situ resultou em diferentes perdas de dureza apenas entre a primeira e a terceira desmineralização erosiva.

A Tabela 3 mostra a recuperação de dureza superficial do esmalte. Uma diferença estatística foi encontrada apenas para a evolução da ciclagem erosiva ($\alpha = 0,000$) sem interações significativas. Portanto, a porcentagem de recuperação de dureza superficial promovida pelos tipos de saliva estudados foi semelhante. No entanto, para todos os grupos, essa porcentagem de recuperação diminuiu com a evolução da ciclagem erosiva.

Discussão

A saliva, composta por componentes inorgânicos (cálcio, fosfato e flúor) e orgânicos (proteínas e glicoproteínas) é considerada o principal modulador biológico em relação ao desenvolvimento do desgaste dentário erosivo (Buzalaf et al., 2012; Hara; Zero, 2014). Com isto, estudos têm se direcionado em estratégias para aumentar o efeito protetor contra a erosão dentária, adicionando possíveis proteínas nestas salivas, afim de aumentar a proteção principalmente da película adquirida do esmalte, a qual é formada a partir da adsorção seletiva de proteínas na superfície dentária a partir do contato com a saliva (Buzalaf et al., 2012; Hannig; Joiner, 2006; Hara; Zero, 2010; Hannig; Hannig, 2014 Vukosavljevic et al., 2014). Dentre estas proteínas, muitas delas possuem importantes funções para manter a integridade da superfície dentária, formando uma barreira de proteção semipermeável (Hannig; Joiner, 2006; Vitorino et al., 2007, Buzalaf et al., 2012, Siqueira et al., 2012).

Na película adquirida foi observado que muitas proteínas possuem funções antibacterianas, antifúngicas, bem como ácido-resistentes. Uma das principais proteínas para a formação da película adquirida é a mucina, a qual possui uma importante função de lubrificação, além de ter sido considerada ácido-resistente, quando, após episódios de desafios erosivos in vivo esta proteína ainda permaneceu na película adquirida após análise proteômica (Delecrode, Siqueira et al. 2015). As mucinas são glicoproteínas de alto peso molecular, consideradas os principais componentes orgânicos da saliva sublingual/ submandibular (Buzalaf et al., 2012). Os resultados dos estudos utilizando mucina ainda são conflitantes (Ionta., 2014; Jordão et al., 2017), por isso optamos em adicionar a mucina na saliva humana coletada pois ainda não se sabe com clareza o quanto a degradação salivar após sua retirada da

cavidade oral afeta essa proteína. Com relação ao tempo de exposição salivar de duas horas nos baseamos em estudos anteriores que concluíram que esse período parece ser apropriado para o endurecimento parcial da superfície do esmalte amolecido entre os desafios erosivos (Alencar et al., 2016; Mendonça et al., 2017).

No presente estudo o principal objetivo foi avaliar o impacto da saliva humana com e sem mucina *in vitro* na inibição da desmineralização erosiva e no endurecimento do esmalte quando comparado ao efeito da saliva humana in situ. Neste sentido, na primeira ciclagem foi possível observar que, o grupo Gsitu demonstrou uma menor desmineralização quando comparado aos grupos Gvitro e GvitroM. Estes resultados já eram esperados, uma vez que o grupo *in situ* foi considerado nosso controle positivo, além disso na condição do *in situ* ocorre uma troca constante da saliva, o que não ocorre nas condições *in vitro*. Por outro lado, na primeira ciclagem não foi observado diferença entre os grupos Gvitro e GvitroM, apesar da adição da proteína mucina, não foi possível observar uma menor desmineralização. Em estudo anterior realizado pelo nosso grupo de pesquisa no qual avaliaram formulações de saliva artificial e saliva humana in situ, observaram que apenas a saliva artificial com mucina teve comportamento semelhante a saliva humana in situ e que não houve diferença estatística entre as salivas artificiais com e sem mucina no experimento de re endurecimento, apenas no experimento da desmineralização (Jordão et al., 2017). Acreditamos que isso possa ter ocorrido porque, apesar da adição da proteína, pode ocorrer uma competição de sitio de ligação das proteínas da película nas condições de salivas humanas *in vitro*, e mesmo que no grupo GvitroM houvesse uma concentração de mucina maior, no grupo Gvitro foi utilizado saliva humana a qual já possui uma concentração de mucina, que pode não ter sofrido uma degradação expressiva(Carpenter, Cotroneo et al. 2014, Gibbins, Proctor et al. 2014) (Tabela 2).

Na segunda ciclagem, o grupo GvitroM promoveu uma menor desmineralização em comparação aos grupos Gvitro e Gsitu. Este dado nos chamou atenção, uma vez que o grupo *in situ* foi considerado nosso grupo controle. Porém, acreditamos que nesta segunda ciclagem a condição in vitro pode ter potencializado a manutenção das proteínas. Como mencionado acima, na condição *in situ* ocorre uma troca constante da saliva devido ao fluxo salivar, o que não ocorre nas condições *in vitro*. Portanto, quando a película se formou pelo período acumulativo de 4h no grupo GvitroM, a proteína mucina pode ter se ligado em todo o sitio de ligação do esmalte, favorecendo este grupo a ter uma maior proteção contra o ataque erosivo com ácido cítrico, uma vez que a mucina é considerada uma proteína ácido-resiste após exposição ao ácido cítrico (Delecrode, Siqueira et al. 2015). Por outro lado, a saliva humana coletada apresenta efeito protetor reduzido com o tempo devido a degradação ocasionada pela

quebra de proteínas, esgotamento inorgânico e mudanças de pH, diminuindo sua capacidade de prevenir a erosão. Desta forma, os próprios resultados da terceira ciclagem, nos fizeram rejeitar essa suposição pois com o período cumulativo de 6h não houve aumento da diferença entre os grupos com um efeito protetor maior para o grupo com mucina, pelo contrário, todos os grupos resultaram em efeito semelhante. Em estudo anterior em que foi avaliado o efeito preventivo da erosão de diferentes formulações de saliva artificial, saliva humana in vitro em comparação com a saliva humana in situ, também não foi encontrada diferença significativa entre os grupos por meio da microdureza (Batista et al. 2016). Porém, na análise de perda de cálcio pôde-se observar menor perda para o grupo in situ. Assim os autores hipotetizaram que a perda de dureza não seria uma variável de reposta sensível. Entretanto não se pode questionar a utilização da dureza no presente estudo, pois esse método foi capaz de detectar diferenças na primeira ciclagem. Uma segunda teoria seria de que apesar da menor proteção das formulações in vitro na primeira ciclagem, elas poderiam ter promovido um maior re endurecimento o que acarretaria em maior proteção na segunda ciclagem, no entanto os resultados da porcentagem de recuperação de dureza não confirmam esse raciocínio.

Por outro lado, com relação a recuperação de dureza superficial o comportamento foi semelhante para todos os grupos. Uma diferença estatística foi encontrada apenas para a evolução da ciclagem erosiva, ou seja, as três salivas tiveram seu potencial de re endurecimento superficial diminuído com o avanço das ciclagens. Ionta et al., (2014), analisaram a capacidade remineralizante de diferentes formulações de saliva artificial sobre lesão erosiva inicial do esmalte. Apesar de não terem avaliado nenhuma saliva humana como no presente estudo, os autores também compararam o impacto do acréscimo de mucina e concluíram que não houve diferença entre a formulação de Klimek (1982) e a mesma sem mucina. Hara et al., (2008), avaliaram formulações de saliva artificial com e sem mucina num processo de ciclagem de erosão-abrasão, e observaram que a saliva sem mucina proporcionou um menor desgaste. Sugeriram que a presença do conteúdo orgânico dificultou a redeposição mineral o que não foi observado no presente estudo, pelo menos no que diz respeito ao acréscimo de mucina, além da que existe na saliva humana.

Um resultado bastante interessante foi de que independentemente da proteção contra a erosão, as salivas promoveram ganhos semelhantes e foram decrescendo com tempo, o que pode sinalizar que quanto maior o desafio menor o potencial de reparo. Possivelmente o efeito protetor maior da saliva seja na proteção contra a desmineralização e não tanto no seu re endurecimento.

Apesar das limitações do presente estudo, todas as salivas apresentaram um

comportamento semelhante ao final da terceira ciclagem da desmineralização, porem diante da variação de comportamento em relação ao potencial protetor nos diferentes ciclos sugere-se a necessidade em realizar novo estudo com maior número de ciclagens para confirmar se este padrão se manterá. Além disso, seria interessante avaliar o impacto da mucina quando há associação com escovação, pois a mucina pode alterar as propriedades reológicas da saliva. Considerando os episódios de desmineralização e re endurecimento, a saliva humana com adição de mucina em condições *in vitro* pode fornecer uma proteção contra a desmineralização do esmalte semelhante à saliva humana *in situ* e à saliva humana *in vitro*. Ou seja, a adição de mucina na saliva humana não potencializou o efeito protetor contra a desmineralização e nem o re endurecimento da superfície de esmalte erodida.

Referências

Alaraudanjoki V, Saarela H, Pesonen R, Laitala M-L, Kiviahde H, Tjaderhane L, Lussi A, Pesonen P, Anttonen V. Is a Basic Erosive Wear Examination (BEWE) reliable for recording erosive tooth wear on 3D models?. J Dent. 2017;59:26-32.

Alencar CR, Mendonça FL, Guerrini LB, Jordão MC, Oliveira GC, Honório HM, Magalhães AC, Rios D. Effect of different salivary exposure times on the rehardening of acid-softned enamel. Braz Oral Res. 2016;1:e104.

Arends J, tem Bosch JJ. Demineralisation and remineralisation evaluation techniques. J Dent Res.1992;71:924-928.

Batista GB, Torres CRG, Sener B, Attin T, Wiegand A. Artificial saliva formulations versus human saliva pretreatment in dental erosion experiments. Caries Res. 2016;50:78-86.

Brevik SC, Lussi A, Rakhmatullina E. A new optical detection method to assess the erosion inhibition by in vitro salivary pellicle layer. J Dent. 2013;5:428-35.

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

Buzalaf MAR, Magalhães AC, Wiegand A. Alternatives to fluoride in the prevention and treatment of dental erosion. Monogr Oral Sci. 2014;25:244-52.

Carpenter G, Cotroneo E, Moazzez R, Rojas-Serrano M, Donaldson N, Austin R, Zaidel L, Bartlett D, Proctor G. Composition of enamel pellicle from dental erosion patients. Caries Res. 2014;5:361-367.

Dawes C. Salivary flow patterns and the health of hard and soft oral tissues. J Am Dent Assoc. 2008;139:18S-24S.

Delecrode TR, Siqueira WL, Zaidan FC, Bellini MR, Leite AL, Xiao Y, Rios D, Magalhaes AC, Buzalaf MAR. Exposure to acids changes the proteomic of acquired dentine pellicle. 2015;5:583-588.

Ganss C, Lussi A. Diagnosis of erosive tooth wear. Monogr Oral Sci. 2014;25:22–31.

Ganss C, Lussi A, Klimek J. Comparison of calcium/phosphorus analysis, longitudinal microradiography and profilometry for the quantitative assessment of erosive demineralisation. Caries Res. 2005;3:178-84.

Gibbins HL, Proctor GB, Yakubov GE, Wilson S, Carpenter GH. Concentration of salivary protective proteins within the bound oral mucosal pellicle. Oral Dis. 2014;7:707-713.

Hannig M, Hannig C. The pellicle and erosion. Monogr Oral Sci. 2014;25:206-14.

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

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

Hara AT, ZERO D. The potential of saliva in protecting against dental erosion. Monogr Oral Sci. 2014;25:197-205.

Hara AT, González-Cabezas C, Creeth J, Zero DT. The effect of human saliva substitutes in an erosion-abrasion cycling model. Eur J Oral Sci. 2008;6:552-6.

Huysmans MC, Chew HP, Ellwood RP. Clinical studies of dental erosion and erosive wear. Caries Res. 2011;45:60–68.

Huysmans MC, Young A, Ganss C. The role of fluoride in erosion therapy. Monogr Oral Sci. 2014;25:230-43.

Ionta FQ, Mendonça FL, de Oliveira GC, de Alencar CR, Honório HM, Magalhães AC, Rios D.In vitro assessment of artificial saliva formulations on initial enamel erosion remineralization. J Dent. 2014;2:175-9.

Jordao MC, Ionta FQ, Bergantin BT, Oliveira GC, Moretto MJ, Honorio HM, Silva TC, Rios D. The Effect of Mucin in Artificial Saliva on Erosive Rehardening and Demineralization. Caries Res. 2017;2:136-140.

Klimek J, Hellwig E, Ahrens G. Effect of plaque on fluoride stability in the enamel after amine fluoride application in the artificial mouth. Deutsch Zahnarztl Z 1982;10:836-40.

Lussi A, Carvalho TS. Erosive tooth wear: a multifactorial condition of growing concern and increasing knowledge. Monogr Oral Sci. 2014;25:1-15.

Marro F, De Lat L, Martens L, Jacquet W, Bottenberg P. Monitoring the progression of erosive tooth wear (ETW) using BEWE index in casts and their 3D images: a retrospective longitudinal study. J Dent. 2018;73:70–75.

Marro F, Jacquet W, Martens L, Keeling A, Bartlett D, O'Toole S. Quantifying increased rates of erosive tooth wear progression in the early permanent dentition. J Dent. 2020;93:103282.

Mendonça FL, Jordão MC, Ionta FQ, Buzalaf MAR, Honório HM, Wang L, Rios D. In situ effect of enamel salivary exposure time and type of intraoral appliance before an erosive challenge. Clin Oral Investig. 2017;8:2465-71.

Nieuw Amerongen AV, Oderkerk CH, Driessen AA. Role of mucins from human whole saliva in the protection of tooth enamel against demineralization in vitro. Caries Res. 1987;4:297-309.

O'Toole S, Osnes C, Bartlett D, Keeling A. Investigation into the validity of WearCompare, a purpose-built software to quantify erosive tooth wear progression. Dent. Mater. 2019;10:1408-14.

O'Toole S, Osnes C, Bartlett D, Keeling A. Investigation into the accuracy and measurement methods of sequential 3D dental scan alignment. Dent. Mater. 2019;3495–50.

Salas MM, Nascimento GG, Huysmans MC, Demarco FF. Estimated prevalence of erosive tooth wear in permanent teeth of children and adolescents: an epidemiological systematic review and meta-regression analysis. J Dent. 2015;1:42-50.

Schlueter N, Amaechi BT, Bartlett D, Buzalaf MAR, Carvalho TS, Ganss C, Hara AT, Huysmans MDNJM, Lussi A, Moazzez R, Vieira AR, West NX, Wiegand A, Young A, Lippert F. Terminology of Erosive Tooth Wear: Consensus Report of a Workshop Organized by the ORCA and the Cariology Research Group of the IADR. Caries Res. 2020;1:2-6.

Schlueter N, Tveit AB. Prevalence of erosive tooth wear in risk groups. Monogr Oral Sci. 2014;25:74-98.

Siqueira WL, Custodio W, McDonald EE. New insights into the composition and functions of the acquired enamel pellicle. J Dent Res. 2012;12:1110-1118.

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

Vitorino R, Calheiros-Lobo MJ, Williams J, Ferrer-Correia AJ, Tomer KB, Duarte JA, Domingues PM, Amado FML. Peptidomic analysis of human acquired enamel pellicle. Biomed Chromatogr. 2007;11:1107-1117.

Vukosavljevic D, Hutter JL, Helmerhorst EJ, Xiao Y, Custodio W, Zaidan FC, Oppenheim FG, Siqueira W. Nanoscale adhesion forces between enamel pellicle proteins and hydroxyapatite. J Dent Res. 2014;5:514-9.

West NX, Davies M, Amaechi BT. In vitro and in situ erosion models for evaluating tooth substance loss. Caries Res. 2011;45((suppl 1)):43-52.

Tabela 1. Valores de média e desvio padrão (± DP) da dureza do esmalte antes e depois de cada desafio erosivo (DE) e recuperação de dureza (RE) das 3 ciclagens erosivas.

Grupo	INICIAL	DES 1	RE 1	DES 2	RE 2	DES 3	RE 3
Gsitu	358.96 (±29.10)	250.98 (±16.62)	289.89 (±24.36)	216.29 (±18.62)	253.96 (±18.29)	207.36 (±29.40)	231.40 (±21.56)
Gvitro	357.17 (±31.87)	197.79 (±19.24)	231.07 (±15.11)	216.70 (±13.45	246.74 (±36.74)	186.64 (±23.33)	206.39 (±29.72)
GvitroM	360.02 (±29.09)	199.23 (±1.01)	225.12 (±2.28)	232.29 (±19.79)	252.78 (±20.65)	202.94 (±17.04)	228.06 (±15.37)

Tabela 2. Média e desvio padrão (± DP) da porcentagem de perda de dureza do esmalte (DES) após cada uma das 3 ciclagens erosivas.

Grupo	% HL 1	% HL 2	% HL 3
Gsitu	29.84 (±4.78)[b]	24.94 (±8.72)[a,b]	18.42 (±10.19) [a]
Gvitro	44.35 (±6.11)[c]	5.99 (±6.27)[d]	23.38 (±7.70)[a]
GvitroM	44.29 (±4.68)[c]	-3.24 (±9.57)[e]	19.47 (±7.13)[a]

Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos e evolução da ciclagem erosiva (ANOVA de dois fatores e teste de Tukey).

Tabela 3. Média e desvio padrão (± DP) da porcentagem de recuperação da dureza do esmalte após cada uma das 3 ciclagens erosivas.

Grupo	% HR 1	% HR 2	% HR 3
Gsitu	35.95 (±17.49)[a,A]	25.39 (±10.18) [a,B]	15.57 (±11.75) [a,C]
Gvitro	42.22 (±15.60)[a,A]	23.08 (±20.26) [a,B]	12.89 (±7.72) [a,C]
GvitroM	45.09 (±15.56)[a,A]	22.49 (±13.70) [a,B]	15.99 (±4.01) [a,C]

Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas entre a evolução do ciclo erosivo. Letras minúsculas semelhantes indicam que não há diferença estatisticamente significativa entre os tipos de saliva (ANOVA de dois fatores e teste de Tukey).

2.2 ARTIGO 2 – Existe uma saliva artificial adequada para simular o efeito da saliva humana nos estudos de desgaste erosivo do esmalte?

Resumo

Objetivos O objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia de diferentes formulações de saliva artificial no desgaste dentário erosivo em comparação com a saliva humana in situ. **Materiais e métodos** Os blocos de esmalte selecionados por dureza superficial foram divididos aleatoriamente em 7 grupos (n = 20): saliva 1 (eletrólitos com 2,7 g de mucina), saliva 2 (saliva 1 sem mucina - somente eletrólitos), saliva 3 (somente eletrólitos) , saliva 4 (eletrólitos com 2,2 g de mucina) e saliva 5 (eletrólitos com 10 g de carboximetilcelulose de sódio), saliva humana in situ e água deionizada. Os blocos foram imersos na saliva em estudo in vitro ou mantidos in situ (10 voluntários) por 2 horas e, em seguida, em ácido cítrico (0,05M, pH 2,5) por 2 min, este ciclo foi realizado 4x / dia por 5 dias. A variável de resposta foi a perda de esmalte, medida por perfilometria, e os dados foram analisados pelo teste de Anova e Turkey ($p < 0,05$). **Resultados** A saliva humana resultou em menor perda de esmalte 2,19 (± 1,73) µm em comparação com água deionizada 13,80 (± 1,52) µm e todas as outras salivas artificiais [saliva 1 = 6,99 (± 1,48), 2 = 11,70 (± 1,88), 3 = 11,67 (± 1,70), 4 = 5,06 (± 1,34) e 5 = 10,53 (± 2,06) µm]. Não houve diferença entre a saliva 2, 3 e 5. **Conclusões** A saliva humana in situ seguida de formulações artificiais de saliva contendo eletrólitos e mucina (salivas 1 e 4) promoveu menor desgaste erosivo, enquanto a saliva artificial sem mucina (saliva 2) e as que contêm apenas eletrólitos (saliva 3) ou eletrólitos e carboximetilcelulose (saliva 5) apresentou maior perda de esmalte.

Relevância clínica Os resultados do presente estudo são úteis para orientar o desenho de futuras pesquisas sobre erosão dentária, contribuindo para a padronização de protocolos de estudos in vitro.

Palavras-chave: Erosão dentária; Esmalte dental; Saliva; *In situ*; *In vitro*

Introdução

O desgaste dentário erosivo (DDE) é um processo multifatorial e cumulativo [1], que tem resultado em crescente preocupação na pesquisa e na prática diária [2], devido à sua alta prevalência [3]. Essa alteração compromete cada vez mais a saúde da dentição a longo prazo [4], uma vez que o grau de perda da superfície dentária é significativo, causando conseqüências deletérias para o indivíduo, como má aparência, sensibilidade dentária e problemas funcionais [5]. Consequentemente, lidar com a erosão dentária é uma questão odontológica cada vez mais

relevante [6].

O DDE é um processo químico-mecânico que resulta na perda de tecido duro dental não causada por bactérias [7], impulsionada por uma interação complexa entre fatores nutricionais e relacionados ao paciente [4]. Na verdade, as estratégias para prevenção e controle do desgaste dentário erosivo incluem principalmente a avaliação dos fatores de risco e a aplicação de medidas preventivas [8, 9] para reduzir a frequência ou o prolongamento do contato entre o ácido e os dentes [7], bem como o uso de produtos ou materiais específicos para proteger as superfícies dos dentes contra ataques erosivos [10].

Portanto, estudos foram realizados para testar métodos preventivos e protocolos de tratamentos para desgaste dentário erosivo [11-20] e muitos deles foram realizados in vitro [11,12,16,17,19]. A erosão in vitro dificilmente concorda quantitativamente com a erosão in situ, pois os efeitos protetores naturais da cavidade oral estão ausentes. Entretanto, as investigações iniciais sobre terapias geralmente partem de protocolos in vitro, apoiadas em vantagens relacionadas ao baixo custo, curta duração e ausência de necessidade de voluntários dispostos a seguir o protocolo do estudo, como em estudos in situ [21-23].

Infelizmente, não há padronização metodológica nos estudos laboratoriais que diferem em tipo e tempo de exposição aos ácidos [24,25] e saliva [26-28]. Várias formulações de saliva artificial estão disponíveis na literatura e mais comumente usadas para esse fim são eletrólitos com carboximetilcelulose, eletrólitos apenas com mucina ou somente eletrólitos [29]. O ideal pode se assemelhar ao efeito da saliva in vivo.

Portanto, este estudo teve como objetivo comparar o efeito in vitro de diferentes formulações de saliva artificial e saliva humana in situ na avaliação do desgaste erosivo. Para esse fim, a hipótese nula testada foi a de que não houve diferenças entre as formulações artificiais de saliva em relação à água deionizada e à saliva humana in situ no desgaste erosivo do esmalte.

Material e métodos

Desenho Experimental

Blocos de esmalte bovino selecionados pelo teste de dureza superficial inicial foram distribuídos aleatoriamente de acordo com o fator investigado em 7 níveis, 6 deles avaliados in vitro e um realizado in situ: Saliva 1 Klimek et al., [30] ; Saliva 2 (Saliva 1 sem mucina); Saliva 3 Eisengurger et al., [31]; Saliva 4 Voronets e Lussi [32]; Saliva 5 Amaechi et al., [33]; água deionizada (grupo controle negativo) e saliva humana (in situ). Um tamanho amostral de 18

voluntários foi estimado com base em um erro tipo I (α) de 5%, erro tipo II (β) de 20%, 2,0 µm de perda de esmalte como a diferença mínima detectável nas médias e 2,3 µm como desvio padrão estimado (obtido em um estudo piloto). Dois blocos adicionais foram usados por precaução. A ciclagem erosiva foi realizada imergindo blocos de esmalte em ácido cítrico por 2 min, seguidos por 2 horas nas soluções em estudo (saliva artificial / água in vitro ou saliva humana in situ) 4 vezes ao dia, durante 5 dias. A variável de resposta foi a perda de esmalte medida por perfilometria.

Preparação e seleção de blocos de esmalte

As coroas dos incisivos bovinos foram cortadas em espécimes quadrados (4x4x4 mm^3) usando uma máquina de corte de serra de baixa velocidade ISOMET (Buelher Ldt., Lake Bluff, IL, EUA) com dois discos de diamante (Extec Corp., Enfield, CT, EUA) separados por um espaçador de 4 mm de espessura. O polimento da superfície dos blocos de esmalte foi realizado com discos de carboneto de silício resfrigerados com água deionizada (320, 600 e 1200 de granulação; Buehler, Lake Bluff, IL, EUA) e papel de feltro molhado por spray de diamante (1µm; Buehler, Ltd. Lake Bluff, IL, EUA). Os blocos de esmalte foram limpos com aparelho de ultrassom por 2 min e os blocos de esmalte com defeitos superficiais, como lesões de mancha branca e rachaduras (aumento de 40 vezes) foram excluídos.

A dureza superficial Knoop foi medida pela média de 5 indentações feitas no centro de cada bloco de esmalte com 25 g por 10 segundos (MicroMet 5114 Hardeness Tester; Buehler Ltd., Lake Bluff, IL, EUA). Cento e vinte e seis blocos de esmalte com valores de dureza superficial entre 282,60 ex 419,60 kgf /mm^2 (dureza superficial média de 357,51 ± 30,95 kgf/mm^2) foram selecionados e divididos aleatoriamente em 7 grupos. No grupo in situ, os blocos foram randomizados entre os 10 voluntários. Os blocos de esmalte foram esterilizados usando óxido de etileno.

Perfilometria inicial

Os blocos de esmalte foram marcados com uma lâmina de bisturi (Embramac, Itapira, SP, Brasil) para definir duas áreas de controle de 1,0 mm (nas extremidades) e uma área de teste de 2,0 mm (no centro). Uma das áreas de controle foi marcada com uma broca como marca de identificação para garantir que os perfis inicial e final fossem medidos exatamente nos mesmos locais. O perfil dos blocos de esmalte foi avaliado por um perfilômetro de contato (Marh, MarSurf GD 25, Göttingen, Alemanha), utilizando um software de contorno (MarSurf XCR 20, Göttingen, Alemanha). Os blocos foram fixados em um suporte específico e o primeiro perfil

foi medido no nível da marca de identificação. Na primeira posição, a localização do bloco de esmalte foi registrada em mm nos eixos x e y. Posteriormente, para cada bloco, foram feitas quatro leituras nas seguintes distâncias da marca sobre o eixo y: 0,5; 0,75; e 1,0μm. O perfil de cada leitura foi salvo individualmente. As duas bordas dos blocos de esmalte correspondentes às áreas de controle foram protegidas com verniz cosmético (Maybelline Colorama, Cosbra Cosmetics Ltda, São Paulo, SP, Brasil) e serviram como referência não exposta ao desafio ácido para mensuração da perda de esmalte.

Preparação de saliva artificial e experimento in vitro

As formulações artificiais de saliva foram preparadas de acordo com a composição descrita em estudos anteriores: Saliva 1 - [30] 0,33g KH_2PO_4, 0,34g Na_2HPO_4, 1,27g KCl, 0,16g NaSCN, 0,58g NaCl, 0,17g $CaCl_2$, 0,16g NH_4Cl 0,2g de ureia, 0,03 g de glicose, 0,002 g de ácido ascórbico, 2,7 g de mucina em 1000 ml de água destilada / pH 7; Saliva 2 (Saliva 1 sem mucina); Saliva 3 - [31] 0,1029g de $CaCl_2$ -$2H_2O$, 0,04066g de $MgCl_2$, 0,544g de KH_2PO_4, 4,766g de Hepes, 2,2365g de KCl em 1000 ml de água destilada / pH 7); Saliva 4 - [32] 0,381 g de NaCl, 0,213 g de $CaCl_2$ - 2 H_2O, 1,114 g de KCl, 0,738 g de KH_2PO_4 e 2,2 g de mucina em 1000 ml de água destilada / pH 7; Saliva 5 - [33] 2 g de metil-p-hidroxibenzoato, 10 g de carboximetilcelulose de sódio, 0,625 g de KCl, 0,059 g de $MgCl_2$ $6H_2O$, 0,166 g de $CaCl_2$ $2H_2O$, 0,804 g de K_2HPO_4 e 0,326 g de KH_2PO_4 em 1000 ml de água destilada / pH 7.

Os blocos de esmalte foram submetidos a ciclagem erosiva por imersão em ácido cítrico (0,05 M, pH 2,5, 17,6 ml / bloco) à temperatura ambiente por 2 minutos, seguida por imersão em saliva artificial por 2 horas. Este ciclo foi repetido 4 vezes por dia durante 5 dias.

Seleção de voluntários e experimento in situ

A aprovação ética deste protocolo de pesquisa foi concedida pelo comitê de ética em pesquisa local (Protocolo nº 49810015.8.0000.5417). Este estudo foi realizado em total conformidade com a Declaração de Helsinque. O consentimento informado por escrito foi obtido de cada voluntário no início do estudo, antes da confirmação de sua elegibilidade. Os critérios de inclusão foram idade ≥ 18 anos, taxa de fluxo salivar fisiológico estimulado > 1 mL / min e saúde bucal adequada. Os critérios de exclusão foram: doença sistêmica, gravidez ou amamentação, tabagismo, uso de aparelhos ortodônticos fixos ou removíveis e uso de compostos fluoretados profissionais nos últimos 2 meses anteriores ao experimento in situ.

Participaram do estudo dez estudantes de graduação e pós-graduação, sem lesões de cárie ou erosão, com idades entre 19 e 30 anos e residentes na mesma área fluoretada (0,70 mg

F / L). Sete dias antes e durante o protocolo in situ, os voluntários foram instruídos a usar a mesma pasta de dentes com flúor (Colgate Total 12®, 1.100 ppm F; Colgate Palmolive Company®, São Paulo, Brasil) e aconselhados a não usar nenhum outro produto com flúor. Eles foram convidados a realizar escovação com creme dental com flúor 1 h antes da inserção dos aparelhos intraorais no início do experimento.

O aparelho palatino foi feito de resina acrílica no modelo de gesso da arcada superior para cada voluntário. Cada aparelho possuía 2 cavidades, uma à direita e outra à esquerda, com 6 x 6 x 3 mm para fixação do bloco de esmalte. Os blocos foram fixados com cera e cuidadosamente adaptados ao nível da superfície da resina acrílica do aparelho. Um fio ortodôntico foi fixado sobre os blocos de esmalte sem tocá-los, a fim de evitar a abrasão dos blocos pela língua e pelos tecidos moles.

Os voluntários usaram o aparelho intraoral durante o horário de trabalho (7h45 às 18h) por 5 dias. Os aparelhos foram removidos por 1 h 45 min para as refeições (total de 8 horas e 30 minutos de uso diário). Quando não estava em uso, o aparelho foi armazenado em gaze úmida e refrigerado para evitar a desidratação do bloco de esmalte. Os desafios erosivos foram realizados quatro vezes ao dia (8h, 10h, 14h e 16h) por imersão ex vivo do aparelho contendo os blocos de esmalte em ácido cítrico (0,05M, pH 2,5, 17,6 ml / bloco) em temperatura ambiente por 2 min. Imediatamente após a erosão, o aparelho foi lavado em água de torneira e reinserido na boca [23,34].

Perfilometria final e medição do desgaste da superfície

Ao final do ciclo erosivo, os blocos de esmalte foram removidos dos aparelhos intraorais e o verniz cosmético das unhas foi removido das áreas de controle. Os blocos de esmalte foram fixados no suporte do perfilômetro de acordo com sua medida inicial. A marca de identificação foi usada para confirmar a reprodutibilidade da posição. Três leituras na mesma área inicial foram realizadas usando o mesmo software (XCR 20, MarSurf GD 25, Göttingen, Alemanha) e os parâmetros de medição descritos acima (perfilometria inicial).

Os perfis inicial e final foram sobrepostos para cada um dos três gráficos. Linhas de regressão paralelas foram construídas com um comprimento de 0,5 mm no perfil inicial e final. A distância vertical entre as linhas de regressão foi definida como a quantidade de perda de tecido (µm). A perda de esmalte foi expressa em µm como os valores médios de três gráficos sobrepostos.

Análise Estatística

A análise estatística foi realizada com o SigmaPlot versão 12.3 (2011 Systat Software,

Alemanha), seguindo as recomendações para pesquisa odontológica. As premissas de igualdade de variâncias e distribuição normal de erros foram verificadas. Como as premissas foram atendidas, a análise de variância unidirecional e o teste post hoc de Tukey foram aplicados. O nível de significância foi estabelecido em 5%.

Resultados

Os dados sobre perda de esmalte resultante do efeito de diferentes formulações artificiais de saliva testadas in vitro, saliva humana in situ e grupo controle, são apresentados na tabela 1. ANOVA a um critério e teste de Tukey mostraram que a perda de esmalte foi maior no grupo controle (água deionizada) em comparação com todos os outros grupos ($p < 0,05$). A saliva humana in situ teve o maior efeito protetor contra o desgaste erosivo, seguida pela saliva 4 e saliva 1 (formulações artificiais de saliva com mucina), com diferença significativa entre elas ($p < 0,05$). Não foram encontradas diferenças entre a saliva 2 (saliva artificial sem mucina) e outras formulações contendo apenas eletrólitos ou eletrólitos com carboximetilcelulose (salivas 3 e 5) ($p > 0,05$).

Discussão

Há grande dificuldade na realização de estudos clínicos em erosão dentária, uma vez que o monitoramento in vivo da lesão é muito difícil e não há como realizar uma avaliação quantitativa dos tecidos dentários ao longo do tempo [35-37]. Mais recentemente, Kumar et al., (2019), avaliando a sensibilidade dos scanners intraorais digitais para medir o desgaste erosivo precoce, demonstraram que a precisão da detecção sub-visual do desgaste não era suficiente para diagnosticar com segurança a ocorrência do desgaste e a interpretação das medições deve ser feita. com cautela [38]. Por esse motivo, as evidências científicas sobre estratégias de prevenção e controle da erosão dentária são baseadas em modelos in vitro [11,12,16,17,19] e in situ [13,20,15,18].

A comparação dos modelos de erosão laboratorial e clínica demonstrou que a erosão do esmalte foi drasticamente reduzida na ordem de dez vezes no modelo clínico [39]. Em situações clínicas, a taxa e a gravidade do desgaste dentário erosivo resultam da interação entre vários fatores comportamentais, químicos e biológicos [40,41,4]. Entre os fatores biológicos, a saliva é considerada o fator com maior potencial para modificar a progressão da erosão dentária [41,42,43] como resultado de sua capacidade tampão, potencial de diluição e desempenho incrível como reservatório de íons cálcio, fosfato e fluoreto necessário para a reposição mineral [43,44]. Além disso, sua porção orgânica contém uma gama de proteínas, glicoproteínas e

macromoléculas que, quando adsorvidas na superfície do esmalte, constituem a película adquirida do esmalte [45,46]. A película adquirida do esmalte possui funções importantes, como lubrificação e proteção da superfície dental subjacente. Atua como uma barreira semi-permeável, diminuindo o contato direto do ácido com o dente [47]. O efeito da saliva é considerado a razão pela qual, em situações in vivo, os danos causados pelo ataque ácido ao esmalte ocorrem mais lentamente do que nas lesões de erosão in vitro [48].

Recentemente, Mutahar et al. (2017) compararam in vitro o efeito da saliva natural (pool de saliva humana) com a saliva artificial de Eisenburger et al. (2001), sem proteína e água deionizada [29,31]. Os resultados mostraram que a erosão do esmalte medida por meio da perfilometria foi menor nos espécimes submetidos ao efeito da saliva humana. No entanto, a coleta, armazenamento e ciclagem podem resultar em alterações e degradação da saliva humana acumulada, como a evaporação de CO_2, alterando o efeito protetor salivar [48,49,50].

No presente estudo, o efeito preventivo da erosão de diferentes formulações artificiais de saliva in vitro foi comparado à saliva humana in situ para simular melhor a condição in vivo. Embora, neste experimento, nenhum dos substitutos salivares tenha protegido o esmalte do desgaste erosivo tanto quanto a saliva humana in situ, eles promoveram menor perda de esmalte do que a água deionizada. Portanto, a hipótese nula de que formulações de salivas artificiais e água deionizada não diferem da saliva humana in situ no desgaste erosivo do esmalte foi rejeitada.

Como protocolo de ciclagem erosiva, os blocos de esmalte foram expostos a 5 dias de 4 ciclos diários de desmineralização e remineralização na tentativa de imitar o efeito da saliva antes, durante e após o processo de erosão. Como o efeito diluidor da saliva é difícil de simular in vitro, as principais propriedades que devem ser imitadas pelos substitutos da saliva nos estudos sobre erosão são sua capacidade de redeposição e seu efeito inibitório contra a desmineralização erosiva [27,51].

Anteriormente Ionta et al. (2014) avaliaram a capacidade remineralizante de diferentes formulações de saliva artificial na lesão erosiva inicial do esmalte promovida pela imersão de blocos de esmalte bovino em ácido cítrico 0,05 M (pH 2,5) por 15 s, o que resultou em amolecimento da superfície sem perda de tecido. Após a desmineralização, os blocos de esmalte foram imersos na formulação da saliva por 2 horas e o endurecimento do esmalte foi medido pelo teste de dureza superficial. Todas as formulações testadas foram capazes de remineralizar parcialmente as lesões erosivas iniciais. Além disso, a mucina não afetou o potencial remineralizante da saliva artificial, uma vez que não houve diferença significativa entre a formulação de Klimek com e sem mucina. Os autores sugeriram que o principal efeito da

mucina deveria ser a redução da desmineralização erosiva [27]. Nesse sentido, Jordão et al. (2017) avaliando o efeito da mucina na saliva artificial no fortalecimento e inibição da erosão relataram que as formulações de saliva artificial testadas promoveram fortalecimento semelhante, mas apenas a formulação de saliva com mucina foi semelhante à saliva humana em relação à proteção do esmalte contra a erosão [51].

As mucinas são glicoproteínas de alto peso molecular que compõem os principais componentes orgânicos da saliva sublingual / submandibular, sendo um componente-chave da película adquirida [43]. As mucinas aderidas à superfície do esmalte inibem a desmineralização do esmalte causada por ataque erosivo em concentrações fisiológicas in vitro [52]. Após a exposição a um desafio ácido, existem algumas alterações proteômicas na película adquirida, embora a mucina ainda possa ser encontrada atuando como uma proteína resistente a ácidos que contribui para a homeostase dentária [53,54]. Portanto, foi relatado que formulações de saliva artificial à base de mucina mostram propriedades reológicas semelhantes às da saliva humana [55]. Este efeito protetor pode ser atribuído à sua alta viscosidade ou sua composição química, que fornece maiores propriedades inibidoras de erosão. A viscosidade da saliva artificial com mucina parece ser semelhante à da saliva humana [56].

É importante observar que o alto suprimento de mucina na saliva que banha os dentes inferiores pode potencializar seu efeito preventivo contra a erosão dentária, como demonstra Jordão et al. (2019), por meio de um estudo in situ, mostraram que o aparelho palatino resultou em maior perda de esmalte em comparação com o mandibular [34]. No entanto, uma das principais dificuldades dos estudos in situ é a adesão ao protocolo por voluntários e foi demonstrado que os voluntários relataram mais conforto ao usar o aparelho palatino [23]. Por esse motivo, esse é o design do aparelho intraoral usado por nosso grupo de pesquisa em nossos estudos de erosão in situ.

Os desafios de erosão foram alcançados com um intervalo de duas horas, porque estudos anteriores observaram que esse período de exposição salivar parece ser apropriado para fortalecer a superfície do esmalte amolecido o máximo possível [57]. No entanto, especula-se que, em termos de prevenção do desgaste erosivo dos dentes, a superfície amolecida do esmalte seja rapidamente perdida, uma vez que os desafios erosivos são repetidos continuamente, reduzindo a oportunidade de redeposição mineral [58]. Portanto, o principal efeito das estratégias preventivas deve ser a proteção da superfície contra a desmineralização, em vez da remineralização [59].

Considerando a proteção natural contra a erosão Baumann et al., 2016 avaliaram o efeito de diferentes componentes e composições da saliva no potencial protetor da película adquirida

contra a erosão do esmalte por meio de quatro tipos diferentes de saliva: saliva humana estimulada (HS), saliva artificial contendo apenas íons (AS), saliva humana dialisada contra saliva artificial, contendo proteínas e íons salivares (HS / AS) e saliva humana dialisada contra água deionizada, contendo apenas proteínas salivares, mas não íons (HS / DW). As amostras de esmalte foram expostas a HS, AS, HS / AS, HS / DW ou uma câmara úmida seguida de erosão com ácido cítrico. A dureza da superfície e o cálcio liberado da superfície das amostras foram medidos e os resultados sugeriram que os diferentes tipos de saliva proporcionavam níveis diferentes de proteção com o HS / DW exibindo proteção significativamente melhor do que todos os outros grupos, da mesma forma que os presentes. Os autores levantaram a hipótese de que isso pode ser devido a uma ligação mais forte das proteínas de ligação de cálcio e fosfato à superfície do esmalte na ausência de íons livres [60].

Aceita-se que os componentes orgânicos da saliva, isoladamente ou interagindo com as propriedades químicas salivares, possam ter um impacto significativo na suscetibilidade da superfície dentária à desmineralização [61] e a influência de proteínas na desmineralização do esmalte varia significativamente, dependendo da quanto é adsorvido e quanto cálcio livre está disponível perto da superfície [62]. As proteínas salivares também podem penetrar nos poros do esmalte abertos pela erosão, agindo como ligamentos-ponte entre as hastes adjacentes e, assim, endurecendo o esmalte, o que foi relatado para proteínas do esmalte [63].

Outra diferença importante na composição das formulações testadas é a carboximetilcelulose (CMC) como ingrediente da saliva 5 [64]. A CMC é reconhecida por suas propriedades de lubrificação, semelhantes às mucinas, o que deveria ter contribuído com uma menor perda de estrutura dental dos espécimes submetidos à saliva 5. No entanto, o desgaste do esmalte medido após o ciclo erosivo com a saliva 5 foi semelhante ao observado na saliva 2 e 3 (sem mucina). Isso pode ser justificado pela constatação de que a CMC reduz o efeito remineralizante da saliva [56,64], pois possui a capacidade de formar complexos com íons cálcio e / ou fosfato, resultando na indisponibilidade desses íons para reforço da lesão [56], que parece ter tido um efeito preponderante no efeito in vitro da saliva no presente estudo.

Esses achados contribuem para elucidar os resultados do presente estudo, uma vez que as formulações artificiais de saliva in vitro não foram capazes de refletir adequadamente as condições in situ de erosão do esmalte. No entanto, tendo em vista a necessidade de estudos in vitro para testar a eficácia de terapias preventivas no desgaste dentário erosivo, o uso de formulações artificiais de saliva contendo mucina, em vez de conter apenas eletrólitos ou eletrólitos e carboximetilcelulose, parece ser mais apropriado.

Conclusão

Em conclusão, a saliva humana in situ seguida de formulações artificiais de saliva contendo eletroctrólitos com mucina promoveu menos desgaste erosivo, enquanto a saliva artificial sem mucina e aquelas contendo apenas eletrólitos ou eletrólitos e carboximetilcelulose apresentaram maior perda de esmalte, sem diferença estatística entre elas.

Referências

1. Carvalho TS, Lussi A, Jaeggi T, Gambon DL (2014) Erosive tooth wear in children. Monogr Oral Sci 25:262-78. doi: 10.1159/000360712.

2. Assunção CM, Schlueter N, Rodrigues JA., Carvalho TS, Lussi A (2018) Do fluoride toothpastes have similar preventive effect in permanent and primary teeth against erosive tooth wear? Int J Paediatr Dent https://doi:10.1111/ipd.12449.

3. Salas MM, Nascimento GG, Vargas-Ferreira F, Tarquinio SB, Huysmans MC, Demarco FF (2015) Diet influenced tooth erosion prevalence in children and adolescents: Results of a meta-analysis and meta-regression. J Dent 43(8), 865-75. doi: 10.1016/j.jdent.2015.05.012.

4. Lussi A, Carvalho TS (2014) Erosive tooth wear: a multifactorial condition of growing concern and increasing knowledge. Monogr Oral Sci 25:1-15. doi: 10.1159/000360380.

5. Loomans B, Opdam N, Attin T, Bartlett D, Edelhoff D, Frankenberger R, et al. (2017) Severe tooth wear: European consensus statement on management guidelines. J Adhes Dent 19(2), 111-9. doi: 10.3290/j.jad.a38102.

6. Hasselkvist A, Johansson A, Johansson A (2016) A 4 year prospective longitudinal study of progression of dental erosion associated to lifestyle in 13 – 14 year-old Swedish adolescents. J Dent 47:55-62. doi: 10.1016/j.jdent.2016.02.002.

7. Carvalho TS, Colon P, Ganss C, Huysmans MC, Lussi A, Schlueter N, Schmalz G, Shellis RP, Bjorg Tveit A, Wiegand A (2016) Consensus Report of the European Federation of Conservative Dentistry: Erosive tooth wear diagnosis and management. Swiss Dent J 126(4): 342-6.

8. Turssi CP, Hara AT, Amaral FLB, Franc FMG, Basting RT (2014). Calcium lactate pre-rinse increased fluoride protection against enamel erosion in a randomized controlled in situ trial. J Dent 42(5): 534-9. doi: 10.1016/j.jdent.2014.02.012.

9. Buzalaf MAR, Magalhães AC, Rios D (2018) Prevention of erosive tooth wear: targeting nutritional and patient-related risks factors. Br Dent J 224(5): 371-8. doi: 10.1038/sj.bdj.2018.173.

10. West NX, Seong J, Hellin N, Eynon H, Barker ML, He T (2017) A clinical study to measure anti-erosion properties of a stabilized stannous fluoride dentifrice relative to a sodium fluoride/triclosan dentifrice. Int J Dent Hyg 15(2): 113-9. doi: 10.1111/idh.12159.

11. Barbosa CS, Montagnolli LG, Kato MT, Sampaio FC, Buzalaf MA (2012) Calcium glycerophosphate supplemented to soft drinks reduces bovine enamel erosion. J Appl Oral Sci 20(4): 410-3. doi: 10.1590/s1678-77572012000400004.

12. Dionysopoulos D, Tolidis K, Strakas D, Sfeikos T (2019a) Evaluation of a clinical preventive treatment using Er,Cr:YSGG (2780 nm) laser on the susceptibility of enamel to erosive challenge. Lasers Med Sci 34(6): 1089-97. doi: 10.1007/s10103-018-2679-2.

13. Huysmans MC, Jager DH, Ruben JL, Unk DE, Klijn CP, Vieira AM (2011) Reduction of erosive wear in situ by stannous fluoride-containing toothpaste. Caries Res 45(6): 518-23. doi: 10.1159/000331391.

14. Ionta FQ, Alencar CRB, Santos NMD, Bergantin BTP, Val PP, Honório HM, Oliveira TM, Rios D (2018) Effect of palm oil alone or associated to stannous solution on enamel erosive-abrasive wear: A randomized in situ/ex vivo study. Arch Oral Biol 95:68-73. doi: 10.1016/j.archoralbio.2018.07.013.

15. Kato MT, Buzalaf MAR (2012) Iron supplementation reduces the erosive potential of a cola drink on enamel and dentin in situ. J Appl Oral Sci 20(3): 318-22. doi: 10.1590/s1678-77572012000300004.

16. Magalhães AC, Levy FM, Rizzante FA, Rios D, Buzalaf MA (2012) Effect of NaF and TiF(4) varnish and solution on bovine dentin erosion plus abrasion in vitro. Acta Odontol Scand 70(2): 160-4. doi: 10.3109/00016357.2011.600711.

17. Manarelli MM, Vieira AE, Matheus AA, Sassaki KT, Delbem AC (2011). Effect of mouth rinses with fluoride and trimetaphosphate on enamel erosion: an in vitro study. Caries Res 45(6): 506-9. doi: 10.1159/000331929.

18. Moretto MJ, Delbem AC, Manarelli MM, Pessan JP, Martinhon CC (2013). Effect of fluoride varnish supplemented with sodium trimetaphosphate on enamel erosion and abrasion: an in situ/ex vivo study. J Dent 41(12): 1302-6. doi: 10.1016/j.jdent.2013.09.008.

19. Rakhmatullina E, Beyeler B, Lussi A (2013) Inhibition of enamel erosion by stannous fluoride containing rinsing solutions. Schweiz Monatsschr Zahnmed 123(3): 192-8.

20. Ren YF, Liu X, Fadel N, Malmstrom H, Barnes V, Xu T (2011) Preventive effects of dentifrice containing 5000 ppm fluoride against dental erosion in situ. J Dent 39(10): 672-8. doi: 10.1016/j.jdent.2011.07.009.

21. Hara AT, González-Cabezas C. Creeth J, Zero DT (2008) The effect of human saliva substitutes in an erosion-abrasion cycling model. Eur J Oral Sci 116(6): 552-6. doi: 10.1111/j.1600-0722.2008.00575.x.

22. West NX, Davies M, Amaechi BT (2011) In vitro and in situ erosion models for evaluating tooth substance loss. Caries Res 45 Suppl 1:43-52. doi: 10.1159/000325945.

23. Santos NM, Jordão MC, Ionta FQ, Mendonça FL, Di Leone CCL, Buzalaf MAR, et al. (2018) Impact of a simplified in situ protocol on enamel loss after erosive challenge. PLoS One 13(5):e0196557. doi: 10.1371/journal.pone.0196557. eCollection 2018.

24. Dionysopoulos D, Tolidis K, Sfeikos T (2019b) Effect of CPP-ACPF and Nano-hydroxyapatite Preventive Treatments on the Susceptibility of Enamel to Erosive Challenge. Oral Health Prev Dent 17(4): 357-364. doi: 10.3290/j.ohpd.a42690.

25. Moda MD, Fagundes TC, Bresciani E, Briso ALF, Dos Santos PH (2019) Comparison of in vitro erosion protocols in bovine teeth to simulate natural erosion lesion: analysis of mechanical properties and surface gloss. J Appl Oral Sci 27:e20180107. doi: 10.1590/1678-7757-2018-0107.

26. Leung VW, Darvell BW (1997) Artificial salivas for in vitro studies of dental materials. J Dent 25(6): 475-84. doi: 10.1016/s0300-5712(96)00068-1.

27. Ionta FQ, Mendonça FL, de Oliveira GC, de Alencar CRB, Honório HM, Magalhães AC, Rios D (2014) In vitro assessment of artificial saliva formulations on initial enamel erosion remineralization. J Dent 42(2): 175-9. doi: 10.1016/j.jdent.2013.11.009.

28. Batista GR, Rocha Gomes Torres C, Sener B, Attin T, Wiegand A (2016) Artificial Saliva Formulations versus Human Saliva Pretreatment in Dental Erosion Experiments. Caries Res 50(1): 78-86. doi: 10.1159/000443188.

29. Mutahar M, Carpenter G, Bartlett D, German M, Moazzez R (2017) The presence of acquired enamel pellicle changes acid-induced erosion from dissolution to a softening process. Sci Rep 7(1): 10920. doi: 10.1038/s41598-017-11498-1.

30. Klimek J, Hellwig E, Ahrens G (1982) Effect of plaque on fluoride stability in the enamel after amine fluoride application in the artificial mouth. Deutsch Zahnarztl Z 37(10): 836-40.

31. Eisenburger M, Addy M, Hughes JA, Shellis RP (2001) Effect of time on the remineralisation of enamel by synthetic saliva after citric acid erosion. Caries Res 35(3): 211-5. doi: 10.1159/000047458.

32. Voronets J, Lussi A (2010) Thickness of softened human enamel removed by toothbrush abrasion: an in vitro study. Clin Oral Investig 14(3): 251-6. doi: 10.1007/s00784-009-0288-y.

33. Amaechi BT, Higham SM, Edgar WM (1999) Techniques for the production of dental erosion lesions in vitro. J Oral Rehabil 26(2): 97-102. doi: 10.1046/j.1365-2842.1999.00349. x.

34. Jordão MC, Ionta FQ, Bergantin BTP, Mendonça FL, Santos NMD, Honório HM, Oliveira TM, Rios D (2019) Influence of mandibular and palatal intraoral appliances on erosion in situ study outcome. J Appl Oral Sci 27: e20180153. doi: 10.1590/1678-7757-2018-0153.

35. Ganss C, Lussi A, Klimek J (2005) Comparison of calcium/phosphorus analysis, longitudinal microradiography and profilometry for the quantitative assessment of erosive demineralization. Caries Res 39(3): 178-84. doi: 10.1159/000084795.

36. Arends J, Bosch JT (1992) Demineralization and remineralization evaluation techniques. J Dent Res 71:924-8. doi: 10.1177/002203459207100S27.

37. Brevik SC, Lussi A, Rakhmatullina E (2013) A new optical detection method to assess the erosion inhibition by in vitro salivary pellicle layer. J Dent 41(5): 428-35. doi: 10.1016/j.jdent.2013.02.011.

38. Kumar S, Keeling A, Osnes C, Bartlett D, O'Toole S (2019) The sensitivity of digital intraoral scanners at measuring early erosive wear. J Dent 81:39-42. doi: 10.1016/j.jdent.2018.12.005.

39. West NX, Maxwell A, Hughes JA, Parker DM, Newcombe RG, Addy M (1998) A method to measure clinical erosion: the effect of orange juice consumption on erosion of enamel. J Dent 26(4): 329-35. doi: 10.1016/s0300-5712(97)00025-0.

40. Lussi A, Jaeggi T (2006) Extrinsic causes of erosion. Diet. Chemical factors, in: M.O. Schi (Ed.), Dental Erosion: From Diagnosis to Therapy, Basel, Karger, 20:77-87.

41. Magalhães AC, Wiegand A, Rios D, Honório HM, Buzalaf MA (2009) Insights into preventive measures for dental erosion. J Appl Oral Sci 17(2): 75-86. doi: 10.1590/S1678-77572009000200002.

42. Hara AT, Lussi A, Zero DT (2006) Biological factors. Monogr Oral Sci 20:88-99.

43. Buzalaf MA, Hannas AR, Kato MT (2012) Saliva and dental erosion. J Appl Oral Sci 20(5): 493– 502. doi: 10.1590/s1678-77572012000500001.

44. Siqueira W, Zhang W, Helmerhorst EJ, Gygi SP, Oppenheim FG (2007) Identification of protein components in in vivo human acquired enamel pellicle using LC-ESI-MS/MS. J Proteome Res 6(6): 2152-60. doi: 10.1021/pr060580k.

45. Hannig M, Balz M (2001) Protective Properties of Salivary Pellicles from Two Different Intraoral Sites on Enamel Erosion. Caries Res 35(2): 142-8. doi: 10.1159/000047446.

46. Dodds MW, Johnson DA, Yeh CK (2005) Health benefits of saliva: a review. J Dent 33(3): 223-33. doi: 10.1016/j.jdent.2004.10.009.

47. Siqueira WL, Custodio W, McDonald EE (2012) New insights into the composition and functions of the acquired enamel pellicle. J Dent Res 91(12):1110-18. doi: 10.1177/0022034512462578.

48. Hall A, Buchanan CA, Millett DT, Creanor SL, Strang R, Foye RH (1999) The effect of saliva on enamel and dentine erosion. J Dent 27(5): 333–339. doi: 10.1016/s0300-5712(98)00067-0.

49. Zwier N, Huysmans MC, Jager DH, Ruben J, Bronkhorst EM, Truin GJ (2013) Saliva parameters and erosive wear in adolescents. Caries Res 47(6): 548–552. doi: 10.1159/000350361.

50. Schipper RG, Silletti E, Vingerhoeds MH (2007) Saliva as research material: biochemical, physicochemical and practical aspects. Arch Oral Biol 52(12):1114-35. doi: 10.1016/j.archoralbio.2007.06.009.

51. Jordão MC, Ionta FQ, Bergantin BT, Oliveira GC, Moretto MJ, Honório HM, Silva TC, Rios D (2017) The Effect of Mucin in Artificial Saliva on Erosive Rehardening and Demineralization. Caries Res 51(2): 136-140. doi: 10.1159/000454817.

52. Nieuw Amerongen AV, Oderkerk CH, Driessen AA (1987) Role of mucins from human whole saliva in the protection of tooth enamel against demineralization in vitro. Caries Res 21(4): 297-309. doi: 10.1159/000261033.

53. Delecrode TR, Siqueira WL, Zaidan FC, Bellini MR, Leite AL, Xiao Y, Rios D Magalhães AC, Buzalaf MA (2015) Exposure to acids changes the proteomic of acquired dentine pellicle. J Dent 43(5): 583–8. doi: 10.1016/j.jdent.2015.02.001.

54. Delecrode TR, Siqueira WL, Zaidan FC, Bellini MR, Moffa EB, Mussi MC, Xiao Y, Buzalf MA (2015) Identification of acid-resistant proteins in acquired enamel pellicle. J Dent 43(12): 1470-5. doi: 10.1016/j.jdent.2015.10.009.

55. Christersson CE, Lindh L, Arnebrant T (2000) Film- forming properties and viscosities of saliva substitutes and human whole saliva. Eur J Oral Sci 108(5): 418-25. doi: 10.1034/j.1600-0722.2000.108005418.x.

56. Vissink A, Gravenmade EJ, Gelhard TB, Panders AK, Franken MH (1985) Rehardening properties of mucin- or CMC-containing saliva substitutes on softened human enamel. Effects of sorbitol, xylitol and increasing viscosity. Caries Res 19(3): 212-8. doi: 10.1159/000260846.

57. Alencar CR, Mendonça FL, Guerrini LB, Jordão MC, Oliveira GC, Honório HM, Magalhães AC, Rios D (2016) Effect of different salivary exposure times on the rehardening of acid-softened enamel. Braz Oral Res 30(1): e104. doi: 10.1590/1807-3107BOR-2016.

58. Huysmans MC, Young A, Ganss C (2014) The role of fluoride in erosion therapy. Monogr Oral Sci 25:230-43. doi: 10.1159/000360555.

59. Magalhães AC, Wiegand A, Rios D, Buzalaf MA, Lussi A (2011) Fluoride in dental erosion. Monogr Oral Sci 22:158-70. doi: 10.1159/000325167.

60. Baumann T, Kozik J, Lussi A, Carvalho TS (2016) Erosion protection conferred by whole human saliva, dialysed saliva, and artificial saliva. Sci Rep 5; 6:34760. doi: 10.1038/srep34760.

61. Hara AT, Zero DT (2014) The potential of saliva in protecting against dental erosion. Monogr Oral Sci 25:197–205. doi: 10.1159/000360372.

62. Combes C, Rey C (2002) Adsorption of proteins and calcium phosphate materials bioactivity. Biomaterials 23(13): 2817–23. doi: 10.1016/s0142-9612(02)00073-x.

63. Yahyazadehfar M, Arola D (2015) The role of organic proteins on the crack growth resistance of human enamel. Acta Biomater 19:33–45. doi: 10.1016/j.actbio.2015.03.011.

64. Amaechi BT, Higham SM (2001) In vitro remineralisation of eroded enamel lesions by saliva. J Dent 29(5): 371-6. doi: 10.1016/s0300-5712(01)00026-4.

Tabela 1. Valores de média e desvio padrão (DP) de perda de esmalte (µm) das formulações estudadas.

Grupos	**Média e ±DP (µm)***
G1 - Saliva 1 (formulação de Klimek)	6.99 (± 1.48)[a]
G2 - Saliva 2 (formulação de Klimek sem mucina)	11.70 (± 1.88)[b]
G3 - Saliva 3 (formulação de Eisenburger)	11.67 (± 1.70)[b]
G4 - Saliva 4 (formulação de Voronets)	5.06 (± 1.34)[c]
G5 - Saliva 5 (formulação de Amaechi)	10.53 (± 2.06)[b]
G6 – Saliva humana (in situ)	2.19 (± 1.73)[d]
G7 - Controle (água deionizada)	13.80(± 1.52)[e]

* Na segunda coluna, os valores seguidos por letras distintas diferem significativamente (ANOVA de uma via e teste de Tukey) ($p < 0,05$).

3 DISCUSSÃO

3 DISCUSSÃO

A discussão foi dividida em metodologia e resultados para melhor compreensão dos estudos.

3.1 Metodologia

O presente estudo avaliou o comportamento de formulações de salivas artificiais, saliva humana coletada e saliva humana in situ em eventos de desmineralização e re endurecimento da superfície dentária em dois aspectos distintos. Há grande dificuldade na realização de estudos clínicos em erosão dentária, uma vez que o monitoramento in vivo da lesão é muito difícil e não há como realizar uma avaliação quantitativa dos tecidos dentários ao longo do tempo (GANSS; LUSSI; KLIMEK, 2005; BREVIK; LUSSI; RAKHMATULLINA, 2013). A princípio quando o ácido entra em contato com a superficie do esmalte dentário ocorre o amolecimento da superficie com perda da integridade estrutural e da resistência mecânica. Nesse primeiro momento ainda pode haver a redeposição mineral (SHELLIS; ADDY, 2014). Se houver a continuidade desses eventos de desmineralização, ocorrerá a perda irreversível, que é conhecida como desgaste dentário erosivo (HUYSMANS; CHEW; ELLWOOD, 2011; SHELLIS; ADDY, 2014). Portanto, o principal efeito das estratégias preventivas deve ser a proteção da superfície contra a desmineralização, em vez da remineralização (MAGALHÃES et., 2011). O aspecto inicial da erosão dentária foi avaliado no primeiro artigo e o desgaste dentário erosivo foi avaliado no segundo artigo. No artigo 1 avaliamos o efeito preventivo da mucina na saliva humana coletada em comparação com a saliva humana in situ na inibição (DES) e re endurecimento (RE) do esmalte em relação à erosão em seus estágios iniciais, de amolecimento da superfície dentária. E no artigo 2 o objetivo foi avaliar a eficácia de diferentes formulações de saliva artificial no desgaste do esmalte erosivo em comparação com a saliva humana in situ.

Diversos estudos foram realizados para testar métodos preventivos e protocolos de tratamentos para desgaste dentário erosivo (BARBOSA et al., 2012; REN et al., 2011) e muitos deles foram realizados in vitro (BARBOSA et al., 2012; DIONYSOPOULOS et al., 2019; MAGALHÃES et al., 2012; MANARELLI et al., 2011; RAKHMATULLINA; BEYELER;

LUSSI, 2013). A erosão in vitro dificilmente concorda quantitativamente com a erosão in situ, pois os efeitos protetores naturais da cavidade oral estão ausentes. Entre os fatores biológicos, a saliva é considerada o fator com maior potencial para modificar a progressão da erosão dentária (MAGALHÃES et al., 2009; HARA; LUSSI; ZERO, 2006; BUZALAF; HANNAS; KATO, 2012) como resultado de sua capacidade tampão, potencial de diluição e reservatório de íons cálcio, fosfato e fluoreto necessário para a reposição mineral (BUZALAF; HANNAS; KATO, 2012; SIQUEIRA et al., 2007). Além disso, sua porção orgânica contém uma gama de proteínas, glicoproteínas e macromoléculas que, quando adsorvidas na superfície do esmalte, constituem a película adquirida do esmalte (HANNIG; BALZ, 2001). A película adquirida do esmalte possui funções importantes, como lubrificação e proteção da superfície dental subjacente. Atua como uma barreira semi-permeável, diminuindo o contato direto do ácido com o dente (SIQUEIRA; CUSTODIO; McDONALD, 2012). O efeito da saliva é considerado a razão pela qual, em situações in vivo, os danos causados pelo ataque ácido ao esmalte ocorrem mais lentamente do que nas lesões de erosão in vitro (HALL et al., 1999). Por esses motivos, em ambos os artigos a saliva humana in situ, que foi nosso controle positivo.

Uma das principais proteínas para a formação da película adquirida é a mucina, a qual possui uma importante função de lubrificação, além de possuir propriedades ácido-resistente, quando, após episódios de desafios erosivos in vivo esta proteína ainda permaneceu na película adquirida após análise proteômica (DELECRODE; SIQUEIRA, 2015). As mucinas são glicoproteínas de alto peso molecular, consideradas os principais componentes orgânicos da saliva sublingual/ submandibular (BUZALAF et al., 2012). Os resultados dos estudos utilizando mucina ainda são conflitantes (IONTA et al., 2014; JORDÃO et al., 2017), por isso no artigo 1 optamos em adicionar a mucina na saliva humana coletada pois ainda não se sabe com clareza o quanto a degradação salivar após sua retirada da cavidade oral afeta essa proteína.

Várias formulações de saliva artificial estão disponíveis na literatura e mais comumente usadas para esse fim são eletrólitos com carboximetilcelulose, eletrólitos apenas com mucina ou eletrólitos (MUTAHAR et al., 2017). A ideal deveria se assemelhar ao efeito da saliva in vivo. Portanto, no artigo 2 analisamos diferentes formuações de salivas artificiais comparando com a saliva humana in situ na avaliação do desgaste erosivo. No artigo 1 a variável de resposta foi a porcentagem de perda de dureza superficial. Estudos anteriores consideraram este método adequado para avaliar o amolecimento inicial da superfície do esmalte (HARA; ZERO, 2008; STENHAGEN et al., 2010; YOUNG; TENUTA, 2011). Enquanto no artigo 2 o método escolhido para avaliar o desgaste dentário erosivo foi a perfilometria por ser considerada um

método adequado para análise in vitro do desgaste dentário erosivo (PAEPEGAEY et al., 2013; ATTIN; WEGEHAUPT, 2014; SCHLUETER et al., 2011).

Estudos *in situ* mimetizam melhor a realidade clínica para obtenção de informações científicas (ZERO, 1996; WEST; DAVIES; AMAECHI, 2011), as investigações sobre a eficácia de novas terapias normalmente partem de protocolos *in vitro*, frente às vantagens relativas ao baixo custo e execução ao longo de curtos períodos de tempo, exigência de um número reduzido de recurso humano para sua execução em relação aos estudos *in situ*, os quais requerem a conformidade de voluntários dispostos a seguir o protocolo estabelecido pelo estudo (WEST, DAVIES, AMAECHI, 2011). Apesar das diferenças metodológicas dificultarem a comparação entre os estudos e seus resultados, o objetivo foi aproximar nossos resultados com a situação clínica por meio da comparação de um protocolo in vitro e in situ. Para aumentar a adesão e comprometimento os voluntários selecionados foram apenas alunos da pós-graduação e a orientação foi para utilizarem o dispositivo palatino apenas em horário de trabalho (8h às 12h e das 14h às 18h) de segunda a sexta feira (SANTOS et al., 2018).

O protocolo utilizado no estudo 2 foi de ciclagem erosiva, os blocos de esmalte foram expostos a 5 dias de 4 ciclos diários de desmineralização e remineralização na tentativa de imitar o efeito da saliva antes, durante e após o processo de erosão. Como o efeito diluidor da saliva é difícil de simular in vitro, as principais propriedades que devem ser imitadas pelos substitutos da saliva nos estudos sobre erosão são sua capacidade de redeposição e seu efeito inibitório contra a desmineralização erosive (IONTA et al., 2014; JORDÃO et al., 2017).

No artigo 1 após mensuração da dureza superficial inicial, os blocos foram submetidos a três ciclos erosivos, cada um correspondendo à imersão na saliva em estudo por duas horas e desmineralizados in vitro por imersão em ácido cítrico (0,65%, pH 3,5) por 1 minuto (erosão SMH). Após o último dos três ciclos, os blocos foram imersos na saliva estudada por 2 horas. A medição da dureza foi realizada após cada imersão (saliva e ácido). A variável de resposta foi a porcentagem de perda de dureza. E no artigo 2 os blocos de esmalte foram submetidos a ciclagem erosiva por imersão em ácido cítrico (0,05 M, pH 2,5, 17,6 ml / bloco) à temperatura ambiente por 2 minutos, seguida por imersão em saliva artificial por 2 horas. Os desafios de erosão foram alcançados com um intervalo de duas horas, porque estudos anteriores descobriram que esse período de exposição salivar parece ser apropriado para fortalecer a superfície do esmalte amolecido o máximo possível (AMAECHI et al., 1999; HANNIG et al., 2003; WETTON et al., 2006; MENDONÇA et al., 2016; MENDONÇA et al., 2017).

Uma das limitações de ambos os estudos foi a utilização do esmalte bovino, pois eles apresentam algumas diferenças quimicas e estruturais em comparação com os dentes humanos (RIOS et al., 2006; ATTIN et al., 2007; TURSSI et al., 2010; YASSEN; PLATT; HARA, 2011; ORTIZ-RUIZ et al., 2018), que deve-se levar em consideração ao projetar os resultados para a prática clínica. Entretanto devido a facilidade em se obter grandes quantidades com uma estrutura mais uniforme em comparação com dentes humanos os dentes bovinos sao amplamente utilizados em estudos de erosão dentária in vitro e in situ.

3.2 Resultados

Com relação aos resultados artigo 1, na primeira ciclagem foi possível observar que, o grupo Gsitu demonstrou uma menor desmineralização quando comparado aos grupos Gvitro e GvitroM. Estes resultados já eram esperados, uma vez que o grupo *in situ* foi considerado nosso controle positivo, além disso na condição do *in situ* ocorre uma troca constante da saliva, o que não ocorre nas condições *in vitro*. Por outro lado, na primeira ciclagem não foi observado diferença entre os grupos Gvitro e GvitroM, apesar da adição da proteína mucina, não foi possível observar uma menor desmineralização. Em estudo anterior realizado pelo nosso grupo de pesquisa no qual avaliaram formulações de saliva artificial e saliva humana in situ, observaram que apenas a saliva artificial com mucina teve comportamento semelhante a saliva humana in situ e que não houve diferença estatística entre as salivas artificiais com e sem mucina no experimento de re endurecimento, apenas no experimento da desmineralização (JORDÃO et al., 2017). Acreditamos que isso possa ter ocorrido porque, apesar da adição da proteína, pode ocorrer uma competição de sitio de ligação das proteínas da película nas condições de salivas humanas *in vitro*, e mesmo que no grupo GvitroM houvesse uma concentração de mucina maior, no grupo Gvitro foi utilizado saliva humana a qual já possui uma concentração de mucina, que pode não ter sofrido uma degradação expressiva (CARPENTER et al., 2014; GIBBINS et al., 2014).

Na segunda ciclagem, o grupo GvitroM promoveu uma menor desmineralização em comparação aos grupos Gvitro e Gsitu. Este dado nos chamou atenção, uma vez que o grupo *in situ* foi considerado nosso grupo controle. Porém, acreditamos que nesta segunda ciclagem a condição in vitro pode ter potencializado a manutenção das proteínas. Como mencionado acima, na condição *in situ* ocorre uma troca constante da saliva devido ao fluxo salivar, o que

não ocorre nas condições *in vitro*. Portanto, quando a película se formou pelo período acumulativo de 4h no grupo GvitroM, a proteína mucina pode ter se ligado em todo o sitio de ligação do esmalte, favorecendo este grupo a ter uma maior proteção contra o ataque erosivo com ácido cítrico, uma vez que a mucina é considerada uma proteína ácido-resiste após exposição ao ácido cítrico (DELECRODE et al. 2015). Por outro lado, a saliva humana coletada apresenta efeito protetor reduzido com o tempo devido a degradação ocasionada pela quebra de proteínas, esgotamento inorgânico e mudanças de pH, diminuindo sua capacidade de prevenir a erosão. Desta forma, os próprios resultados da terceira ciclagem, nos fizeram rejeitar essa suposição pois com o período cumulativo de 6h não houve aumento da diferença entre os grupos com um efeito protetor maior para o grupo com mucina, pelo contrário, todos os grupos resultaram em efeito semelhante. Em estudo anterior em que foi avaliado o efeito preventivo da erosão de diferentes formulações de saliva artificial, saliva humana in vitro em comparação com a saliva humana in situ, também não foi encontrada diferença significativa entre os grupos por meio da microdureza (BATISTA et al. 2016). Porém, na análise de perda de cálcio pôde-se observar menor perda para o grupo in situ. Assim os autores hipotetizaram que a perda de dureza não seria uma variável de reposta sensível. Entretanto não se pode questionar a utilização da dureza no presente estudo, pois esse método foi capaz de detectar diferenças na primeira ciclagem. Uma segunda teoria seria de que apesar da menor proteção das formulações in vitro na primeira ciclagem, elas poderiam ter promovido um maior re endurecimento o que acarretaria em maior proteção na segunda ciclagem, no entanto os resultados da porcentagem de recuperação de dureza não confirmam esse raciocínio.

Por outro lado, com relação a recuperação de dureza superficial o comportamento foi semelhante para todos os grupos. Uma diferença estatística foi encontrada apenas para a evolução da ciclagem erosiva, ou seja, as três salivas tiveram seu potencial de re endurecimento superficial diminuído com o avanço das ciclagens. Hara et al., (2008), avaliaram formulações de saliva artificial com e sem mucina num processo de ciclagem de erosão-abrasão, e observaram que a saliva sem mucina proporcionou um menor desgaste. Sugeriram que a presença do conteúdo orgânico dificultou a redeposição mineral o que não foi observado no presente estudo, pelo menos no que diz respeito ao acréscimo de mucina, além da que existe na saliva humana.

Um resultado bastante interessante foi de que independentemente da proteção contra a erosão, as salivas promoveram ganhos semelhantes e foram decrescendo com tempo, o que pode sinalizar que quanto maior o desafio menor o potencial de reparo. Possivelmente o efeito

protetor maior da saliva seja na proteção contra a desmineralização e não tanto no seu re endurecimento.

No artigo 2, o efeito preventivo da erosão de diferentes formulações artificiais de saliva in vitro foi comparado à saliva humana in situ para simular melhor a condição in vivo. Embora, neste experimento, nenhum dos substitutos salivares tenha protegido o esmalte do desgaste erosivo tanto quanto a saliva humana in situ, eles promoveram menor perda de esmalte do que a água deionizada.

Considerando a proteção natural contra a erosão Baumann et al., 2016 avaliaram o efeito de diferentes componentes e composições da saliva no potencial protetor da película adquirida contra a erosão do esmalte por meio de quatro tipos diferentes de saliva: saliva humana estimulada (HS), saliva artificial contendo apenas íons (AS), saliva humana dialisada contra saliva artificial, contendo proteínas e íons salivares (HS / AS) e saliva humana dialisada contra água deionizada, contendo apenas proteínas salivares, mas não íons (HS / DW). As amostras de esmalte foram expostas a HS, AS, HS / AS, HS / DW ou uma câmara úmida seguida de erosão com ácido cítrico. A dureza da superfície e o cálcio liberado da superfície das amostras foram medidos e os resultados sugeriram que os diferentes tipos de saliva proporcionavam níveis diferentes de proteção com o HS / DW exibindo proteção significativamente melhor do que todos os outros grupos, da mesma forma que os presentes. Os autores levantaram a hipótese de que isso pode ser devido a uma ligação mais forte das proteínas de ligação de cálcio e fosfato à superfície do esmalte na ausência de íons livres (BAUMANN et al., 2016).

Aceita-se que os componentes orgânicos da saliva, isoladamente ou interagindo com as propriedades químicas salivares, possam ter um impacto significativo na suscetibilidade da superfície dentária à desmineralização (HARA; ZERO, 2014) e a influência de proteínas na desmineralização do esmalte varia significativamente, dependendo da quanto é adsorvido e quanto cálcio livre está disponível perto da superfície (COMBES; REY, 2002). As proteínas salivares também podem penetrar nos poros do esmalte abertos pela erosão, agindo como ligamentos-ponte entre as hastes adjacentes e, assim, endurecendo o esmalte, o que foi relatado para proteínas do esmalte (YAHYAZADEHFAR; AROLA, 2015).

Outra diferença importante na composição das formulações testadas é a carboximetilcelulose (CMC) como ingrediente da saliva 5 (AMAECHI; HIGHAM, 2001). A CMC é reconhecida por suas propriedades de lubrificação, semelhantes às mucinas, o que

deveria ter contribuído com uma menor perda de estrutura dental dos espécimes submetidos à saliva 5. No entanto, o desgaste do esmalte medido após o ciclo erosivo com a saliva 5 foi semelhante ao observado na saliva 2 e 3 (sem mucina). Isso pode ser justificado pela constatação de que a CMC reduz o efeito remineralizante da saliva (VISSINK et al., 1985; AMAECHI; HIGHAM, 2001), pois possui a capacidade de formar complexos com íons cálcio e / ou fosfato, resultando na indisponibilidade desses íons para reforço da lesão (VISSINK et al., 1985), que parece ter tido um efeito preponderante no efeito in vitro da saliva no presente estudo.

Esses achados contribuem para elucidar os resultados do presente estudo, uma vez que as formulações artificiais de saliva in vitro não foram capazes de refletir adequadamente as condições in situ de erosão do esmalte. No entanto, tendo em vista a necessidade de estudos in vitro para testar a eficácia de terapias preventivas no desgaste dentário erosivo, o uso de formulações artificiais de saliva contendo mucina, em vez de conter apenas eletrólitos ou eletrólitos e carboximetilcelulose, parece ser mais apropriado.

4 CONCLUSÕES

4 CONCLUSÕES

Considerando a hipótese levantada anteriormente, é possível concluir que:

- Artigo 1: Em conclusão, considerando os episódios de desmineralização e re endurecimento, a saliva humana com adição de mucina em condições *in vitro* pode fornecer uma proteção contra a desmineralização do esmalte semelhante à saliva humana *in situ* e à saliva humana *in vitro*. Ou seja, a adição de mucina na saliva humana não potencializou o efeito protetor contra a desmineralização e nem o re endurecimento da superfície de esmalte erodida.

- Artigo 2: Concluimos que a saliva humana in situ seguida de formulações artificiais de saliva contendo eletroctrólitos com mucina promoveu menos desgaste erosivo, enquanto a saliva artificial sem mucina e aquelas contendo apenas eletrólitos ou eletrólitos e carboximetilcelulose resultaram maior perda de esmalte, sem diferença estatística entre elas.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

Addy RP, Shellis M. The interactions between attrition, abrasion and erosion in tooth wear. Monogr Oral Sci. 2014;25:32-45.

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.

Amaechi BT, Higham SM. In vitro remineralisation of eroded enamel lesions by saliva. J Dent. 2001;29(5):371-6.

Amaechi BT, Higham SM. Dental erosion: possible approaches to prevention and control. J Dent. 2005;33(3):243-52.

Arends J, Bosch JT. Demineralization and remineralization evaluation techniques. J Dent Res. 1992;71:924-8.

Attin T, Wegehaupt F, Gries D, Wiegand A. The potential of deciduous and permanent bovine enamel as substitute for deciduous and permanent human enamel: erosion-abrasion experiments. J Dent. 2007;35:773-7.

Attin T, Wegehaupt FJ. Methods for assessment of dental erosion. Monogr Oral Sci. 2014;25:123-42.

Barbosa CS, Montagnolli LG, Kato MT, Sampaio FC, Buzalaf MA. Calcium glycerophosphate supplemented to soft drinks reduces bovine enamel erosion. J Appl Oral Sci. 2012;20(4): 410-3.

Batista GB, Torres CRG, Sener B, Attin T, Wiegand A. Artificial saliva formulations versus human saliva pretreatment in dental erosion experiments. Caries Res. 2016;50:78-86.

Baumann T, Kozik J, Lussi A, Carvalho TS. Erosion protection conferred by whole human saliva, dialysed saliva, and artificial saliva. Sci Rep. 2016;5;6:34760.

Brevik SC, Lussi A, Rakhmatullina E. A new optical detection method to assess the erosion inhibition by in vitro salivary pellicle layer. J Dent. 2013;41(5):428-35.

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

Buzalaf MAR, Magalhães AC, Wiegand A. Alternatives to fluoride in the prevention and treatment of dental erosion. Monogr Oral Sci. 2014;25:244-52.

Carlén A, Börjesson AC, Nikdel K, Olsson J: Composition of pellicles formed in vivo on tooth surfaces in different parts of the dentition, and in vitro on hydroxyapatite. Caries Res. 1998; 32:447–455.

Carpenter, G., E. Cotroneo, R. Moazzez, M. Rojas-Serrano, N. Donaldson, R. Austin, L. Zaidel, D. Bartlett and G. Proctor. "Composition of enamel pellicle from dental erosion patients." Caries Res. 2014;48(5): 361-367.

Cheaib Z, Lussi A. Impact of Acquired Enamel Pellicle Modification on Initial Dental Erosion. Caries Res. 2011;45(2):107-12.

Combes C, Rey C. Adsorption of proteins and calcium phosphate materials bioactivity. Biomaterials. 2002;23(13): 2817–23.

Delecrode TR, Siqueira WL, Zaidan FC, Bellini MR, Moffa EB, Mussi MC, Xiao Y, Buzalf MA. Identification of acid-resistant proteins in acquired enamel pellicle. J Dent. 2015;43(12): 1470-5.

Dionysopoulos D, Tolidis K, Strakas D, Sfeikos T. Evaluation of a clinical preventive treatment using Er,Cr:YSGG (2780 nm) laser on the susceptibility of enamel to erosive challenge. Lasers Med Sci. 2019;34(6): 1089-97.

Dodds MW, Johnson DA, Yeh CK. Health benefits of saliva: a review. J Dent. 2005;33(3): 223-33.

Ganss C, Lussi A, Klimek J. Comparison of calcium/phosphorus analysis, longitudinal microradiography and profilometry for the quantitative assessment of erosive demineralization. Caries Res. 2005;39(3): 178-84.

Ganss C. Definition of erosion and links to tooth wear. Monogr Oral Sci. 2006;20:9-16.

Gibbins HL, Proctor GB, Yakubov GE, Wilson S, Carpenter GH. Concentration of salivary protective proteins within the bound oral mucosal pellicle. Oral Dis. 2014;20(7):707-13.

Hall A, Buchanan CA, Millett DT, Creanor SL, Strang R, Foye RH. The effect of saliva on enamel and dentine erosion. J Dent. 1999;27(5): 333–339.

Hannig M. Transmission electron microscopic study of in vivo pellicle formation on dental restorative materials. Eur J Oral Sci. 1997;105(5 Pt 1): 422–433.

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

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, Hess NJ, Hoth-Hannig W, De Vrese M. Influence of salivary pellicle formation time on enamel emineralization – 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.

Hannig M, Hannig C. The pellicle and erosion. Monogr Oral Sci. 2014;25:206-14.

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

Hara AT, Lussi A, Zero DT. Biological factors. Monogr Oral Sci. 2006;20:88-99.

Hara AT, Zero DT. Analysis of the erosive potential of calcium-containing acidic beverages. Eur J Oral Sci. 2008;116(1):60-5.

Hara AT, Zero DT. The potential of saliva in protecting against dental erosion. Monogr Oral Sci. 2014;25:197–205.

Huysmans MC, Chew HP, Ellwood RP. Clinical studies of dental erosion and erosive wear. Caries Res. 2011;45(Suppl 1):60-8.

Huysmans MC, Jager DH, Ruben JL, Unk DE, Klijn CP, Vieira AM. Reduction of erosive wear in situ by stannous fluoride-containing toothpaste. Caries Res. 2011;45(6):518-23.

Huysmans MC, Young A, Ganss C. The role of fluoride in erosion therapy. Monogr Oral Sci. 2014;25:230-43.

Ionta FQ, Mendonça FL, de Oliveira GC, de Alencar CRB, Honório HM, Magalhães AC, Rios D. In vitro assessment of artificial saliva formulations on initial enamel erosion remineralization. J Dent. 2014;42(2):175-9.

Jagger DH, Vissink A, Timmer CJ, Bronkhorst E, Vieira AM, Huysmans MC. Reduction of erosion by protein-containing toothpastes. Caries Res. 2013;47(2):135-40.

Jordão MC, Ionta FQ, Bergantin BT, Oliveira GC, Moretto MJ, Honório HM, Silva TC, Rios D. The Effect of Mucin in Artificial Saliva on Erosive Rehardening and Demineralization. Caries Res. 2017;51(2):136-140.

Young A, Tenuta LM. Initial erosion models. Caries Res. 2011;45(Suppl 1):33-42.

Kato MT, Buzalaf MA. Iron supplementation reduces the erosive potential of a cola drink on enamel and dentin in situ. J Appl Oral Sci. 2012;20(3):318-22.

Lamkin MS, Arancillo AA, Oppenheim FG. Temporal and compositional characteristics of salivary protein adsorption to hydroxyapatite. J Dent Res. 1996;75(2):803-808.

Lendenmann U, Grogan J, Oppenheim FG. Saliva and dental pellicle—a review. Adv Dent Res. 2000;14:22-28.

Linnett V, Seow WK. Dental erosion in children: A literature review. Pediatr Dent. 2001;23(1):37-43.

Lussi A, Jaeggi T. Erosion--diagnosis and risk factors. Clin Oral Investig. 2008;12(Suppl 1):S5-13.

Lussi A, Bossen A, Höschele C, Beyeler B, Megert B, Meier C, Rakhmatullina E. Effects of enamel abrasion, salivary pellicle, and measurement angle on the optical assessment of dental erosion. J Biomed Opt. 2012;17(9):97009-1.

Lussi A, Carvalho TS. Erosive tooth wear: a multifactorial condition of growing concern and increasing knowledge. Monogr Oral Sci. 2014;25:1-15.

Magalhães AC, Levy FM, Rizzante FA, Rios D, Buzalaf MA. Effect of NaF and TiF(4) varnish and solution on bovine dentin erosion plus abrasion in vitro. Acta Odontol Scand. 2012;70(2):160-4.

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

Manarelli MM, Vieira AE, Matheus AA, Sassaki KT, Delbem AC. Effect of mouth rinses with fluoride and trimetaphosphate on enamel erosion: an in vitro study. Caries Res. 2011;45(6):506-9.

Mendonca FL, Ionta FQ, Alencar CRB, Oliveira GC, Goncalves PSP, Oliveira TM, Honorio HM, Rios D. Impact of Saliva and Intraoral Appliance on Erosion Lesions Rehardening Ability - A Pilot Study. Braz Res Ped Dent Integ Clin. 2016;16(1):51-8.

Mendonca FL, Jordao MC, Ionta FQ, Buzalaf MA, Honorio HM, Wang L, Rios D. In situ effect of enamel salivary exposure time and type of intraoral appliance before an erosive challenge. Clin Oral Investig. 2017;21(8):2465-71.

Moretto MJ, Delbem AC, Manarelli MM, Pessan JP, Martinhon CC. Effect of fluoride varnish supplemented with sodium trimetaphosphate on enamel erosion and abrasion: an in situ/ex vivo study. J Dent. 2013;41(12):1302-6.

Mutahar M, Carpenter G, Bartlett D, German M, Moazzez R. The presence of acquired enamel pellicle changes acid-induced erosion from dissolution to a softening process. Sci Rep. 2017;7(1):10920.

Nekrashevych Y, Hannig M, Stösser L. Assessment of enamel erosion and protective effect of salivary pellicle by surface roughness analysis and scanning electron microscopy. Oral Health Prev Dent. 2004;2(1):5-11.

Nekrashevych Y, Stösser L. Protective Influence of Experimentally Formed Salivary Pellicle on Enamel Erosion. Caries Res. 2003;37(3):225-31.

Nieuw Amerongen AV, Oderkerk CH, Driessen AA. Role of mucins from human whole saliva in the protection of tooth enamel against demineralization in vitro. Caries Res. 1987;21(4):297-309.

Ortiz-Ruiz AJ, Teruel-Fernandez JD, Alcolea-Rubio LA, Hernandez-Fernandez A, Martinez-Beneyto Y, Gispert-Guirado F. Structural differences in enamel and dentin in human, bovine, porcine, and ovine teeth. Ann Anat. 2018;218:7-17.

Paepegaey AM, Barker ML, Bartlett DW, Mistry M, West NX, Hellin N, et al. Measuring enamel erosion: a comparative study of contact profilometry, non-contact profilometry and confocal laser scanning microscopy. Dent Mater. 2013;29(12):1265-72.

Rakhmatullina E, Beyeler B, Lussi A. Inhibition of enamel erosion by stannous and fluoride containing rinsing solutions. Schweiz Monatsschr Zahnmed. 2013;123(3):192-8.

Ren YF, Liu X, Fadel N, Malmstrom H, Barnes V, Xu T. Preventive effects of dentifrice containing 5000 ppm fluoride against dental erosion in situ. J Dent. 2011;39(10):672-8.

Rios D, Honorio HM, Magalhaes AC, Delbem AC, Machado MA, Silva SM, et al. Effect of salivary stimulation on erosion of human and bovine enamel subjected or not to subsequent abrasion: an in situ/ex vivo study. Caries Res. 2006;40(3):218-23.

Santos NM, Jordao MC, Ionta FQ, Mendonca FL, Leone C, Buzalaf MAR, Oliveira TM, Honorio HM. Impact of simplified in situ protocol on enamel loss after erosive challenge. PLoS ONE. 2018;13(5):e0196557.

Schipper RG, Silletti E, Vingerhoeds MH. Saliva as research material: biochemical, physicochemical and practical aspects. Arch Oral Biol. 2007;52(12):1114–35.

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

Schlueter N, Amaechi B, Bartlett D, Buzalaf MAR, Carvalho TS, Ganss C, et al. Terminology of erosive tooth wear: consensus reporto f a workshop organized by the ORCA and the cariology research group of the IADR. 2020;54(1):2-6.

Shellis RP, Ganss C, Ren Y, Zero DT, Lussi A. Methodology and models in erosion research: discussion and conclusions. Caries Res. 2011;45(Suppl 1):69-77.

Shellis RP, Addy M. The interactions between attrition, abrasion and erosion in tooth wear. Monogr Oral Sci. 2014;25:32-45.

Siqueira W, Zhang W, Helmerhorst EJ, Gygi SP, Oppenheim FG. Identification of protein components in in vivo human acquired enamel pellicle using LC-ESI-MS/MS. J Proteome Res. 2007;6(6): 2152–2160.

Siqueira WL, Custodio W, McDonald EE. New insights into the composition and functions of the acquired enamel pellicle. J Dent Res. 2012;91(12):1110-18.

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

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

Sreebny LM: Saliva in health and disease: an appraisal and update. Int Dent J. 2000;50(3):140-61.

Stenhagen KR, Hove LH, Holme B, Taxt-Lamolle S, Tveit AB. Comparing different methods to assess erosive lesion depths and progression in vitro. Caries Res. 2010;44(6):555-61.

Stenhagen KR, Hove LH, Holme B, Tveit AB. The effect of daily fluoride mouth rinsing on enamel erosive/abrasive wear in situ. Caries Res. 2013;47(1):2-8.

Ten Cate JM, Imfeld T. Dental erosion, summary. Eur J Oral Sci. 1996;104(2(Pt2):241-4.

Turssi CP, Messias DF, Corona SM, Serra MC. Viability of using enamel and dentin from bovine origin as a substitute for human counterparts in an intraoral erosion model. Braz Dent J. 2010;21(4):332-6.

Vissink A, Gravenmade EJ, Gelhard TB, Panders AK, Franken MH. Rehardening properties of mucin- or CMC-containing saliva substitutes on softened human enamel. Effects of sorbitol, xylitol and increasing viscosity. Caries Res. 1985;19(3): 212-8.

West NX, Davies M, Amaechi BT. In vitro an in situ erosion models for evaluating tooth substance loss. Caries Res. 2011;45(Suppl 1):43-52.

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.

Yahyazadehfar M, Arola D. The role of organic proteins on the crack growth resistance of human enamel. Acta Biomater. 2015;19:33–45.

Yassen GH, Platt JA, Hara AT. Bovine teeth as substitute for human teeth in dental research: a review of literature. J Oral Sci. 2011;53(3):273-82.

Zahradnik RT, Moreno EC, Burke EJ. Effect of salivary pellicle on enamel subsurface demineralization in vitro. J Dent Res. 1976;55(4):664–670.

Zahradnik RT, Propas D, Moreno EC. In vitro enamel demineralization by Streptococcus mutans in the presence of salivary pellicles. J Dent Res. 1977;56(9):1107-1110.

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

ANEXOS

ANEXO A – Aprovação do Comite de Ética dos artigos 1 e 2.

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU-USP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Efeito da saliva humana e de diferentes formulações de salivas artificiais com e sem mucina na remineralização, desmineralização e ciclagem erosiva do esmalte: estudo comparativo de protocolos in vitro e in situ.

Pesquisador: Natália Mello dos Santos

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 49810015.8.0000.5417

Instituição Proponente: Universidade de Sao Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.335.395

Apresentação do Projeto:

Idem ao parecer 1.292.374.

Objetivo da Pesquisa:

Idem ao parecer 1.292.374.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Idem ao parecer 1.292.374.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Idem ao parecer 1.292.374.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

A folha de rosto, termos de aquiescência, termo de consentimento livre e esclarecido foram apresentados adequadamente.

Porém:

1- o grupo que doará a saliva humana para o trabalho in vitro necessita também da assinatura de um TCLE, lembrando também de especificar que a saliva coletada e remanescente será descartada. Caso a saliva deste grupo seja coleta a partir dos próprios pesquisadores exclusivamente, não há a

Endereço: DOUTOR OCTAVIO PINHEIRO BRISOLLA 75 QUADRA 9
Bairro: VILA NOVA CIDADE UNIVERSITARIA **CEP:** 17.012-901
UF: SP **Município:** BAURU
Telefone: (14)3235-8356 **Fax:** (14)3235-8356 **E-mail:** cep@fob.usp.br

necessidade de um TCLE, porém deve ser informado. De qualquer forma, havendo TCLE ou apenas a informação da coleta a partir dos pesquisadores, deve-se informar que toda a saliva será descartada, não havendo nenhum material biológico residual.

PENDÊNCIA ATENDIDA.

2- Uma vez que os participantes da pesquisa da etapa in situ podem ser alunos de graduação ou pós-graduação, deve-se apresentar o termo de aquiescência por parte dos coordenadores da Graduação e Pós-graduação, respectivamente.

PENDÊNCIA ATENDIDA

Recomendações:

1- o grupo que doará a saliva humana para o trabalho in vitro necessita também da assinatura de um TCLE, lembrando também de especificar que a saliva coletada e remanescente será descartada. Caso a saliva deste grupo seja coleta a partir dos próprios pesquisadores exclusivamente, não há a necessidade de um TCLE, porém deve ser informado. De qualquer forma, havendo TCLE ou apenas a informação da coleta a partir dos pesquisadores, deve-se informar que toda a saliva será descartada, não havendo nenhum material biológico residual.

PENDÊNCIA ATENDIDA

2- Uma vez que os participantes da pesquisa da etapa in situ podem ser alunos de graduação ou pós-graduação, deve-se apresentar o termo de aquiescência por parte dos coordenadores da Graduação e Pós-graduação, respectivamente.

PENDÊNCIA ATENDIDA.TERMO ANEXADO.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Nada a constar.

Considerações Finais a critério do CEP:

Esse projeto foi considerado APROVADO na reunião ordinária do CEP de 18.11.2015, com base nas normas éticas da Resolução CNS 466/12. Ao término da pesquisa o CEP-FOB/USP exige a apresentação de relatório final. Os relatórios parciais deverão estar de acordo com o cronograma

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU-USP

Continuação do Parecer: 1.335.395

e/ou parecer emitido pelo CEP. Alterações na metodologia, título, inclusão ou exclusão de autores, cronograma e quaisquer outras mudanças que sejam significativas deverão ser previamente comunicadas a este CEP sob risco de não aprovação do relatório final. Quando da apresentação deste, deverão ser incluídos todos os TCLEs e/ou termos de doação assinados e rubricados, se pertinentes.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_568340.pdf	29/10/2015 22:55:47		Aceito
Outros	alunos_pg.pdf	29/10/2015 22:54:38	Natália Mello dos Santos	Aceito
Outros	oficio.pdf	29/10/2015 22:53:17	Natália Mello dos Santos	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.docx	29/10/2015 22:51:36	Natália Mello dos Santos	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	29/10/2015 22:47:22	Natália Mello dos Santos	Aceito
Outros	lab_de_bioq.pdf	23/09/2015 23:01:54	Natália Mello dos Santos	Aceito
Folha de Rosto	folha_de_rosto.pdf	23/09/2015 22:53:16	Natália Mello dos Santos	Aceito
Outros	questionario.pdf	23/09/2015 21:57:09	Natália Mello dos Santos	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	declaracao_instituicao.pdf	23/09/2015 13:21:35	Natália Mello dos Santos	Aceito
Declaração de Pesquisadores	declaracao_de_compromisso.pdf	18/08/2015 14:08:45	Natália Mello dos Santos	Aceito

Situação do Parecer:
Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:
Não

Endereço: DOUTOR OCTAVIO PINHEIRO BRISOLLA 75 QUADRA 9
Bairro: VILA NOVA CIDADE UNIVERSITARIA **CEP:** 17.012-901
UF: SP **Município:** BAURU
Telefone: (14)3235-8356 **Fax:** (14)3235-8356 **E-mail:** cep@fob.usp.br

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU-USP

Continuação do Parecer: 1.335.395

BAURU, 24 de Novembro de 2015

Assinado por:
Izabel Regina Fischer Rubira Bullen
(Coordenador)

Endereço: DOUTOR OCTAVIO PINHEIRO BRISOLLA 75 QUADRA 9
Bairro: VILA NOVA CIDADE UNIVERSITARIA **CEP:** 17.012-901
UF: SP **Município:** BAURU
Telefone: (14)3235-8356 **Fax:** (14)3235-8356 **E-mail:** cep@fob.usp.br

ANEXO B – Confirmação da carta de submissão para Clinical Oral Investigations.

Clinical Oral Investigations <em@editorialmanager.com> 16:32 (há 21 minutos)

para mim

Re: "Is there an adequate artificial saliva to simulate the effect of human saliva on erosive enamel wear studies?"
Full author list: Natália Mello Santos; Catarina Ribeiro Barros Alencar; Camilla Cristina Lira Di Leone; Thais Marchini Oliveira; Thiago Cruvinel; Marília Afonso Rabelo Buzalaf; Daniela Rios, Ph.D

Dear Ms Natália Santos,

We have received the submission entitled: "Is there an adequate artificial saliva to simulate the effect of human saliva on erosive enamel wear studies?" for possible publication in Clinical Oral Investigations, and you are listed as one of the co-authors.

The manuscript has been submitted to the journal by Dr. Dra Daniela Rios who will be able to track the status of the paper through his/her login.

If you have any objections, please contact the editorial office as soon as possible. If we do not hear back from you, we will assume you agree with your co-authorship.

Thank you very much.

With kind regards,

Springer Journals Editorial Office
Clinical Oral Investigations