UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

FABRÍCIA CARDOSO

Efeito de um gel de Proanthocianidina na degradação da matriz orgânica desmineralizada: análise perfilométrica e colagenolítica (ELISA)

BAURU
2021

FABRÍCIA CARDOSO

Efeito de um gel de Proanthocianidina na degradação da matriz orgânica desmineralizada: análise perfilométrica e colagenolítica (ELISA)

Tese 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 Dentística.

Orientador: Prof. Dr. Heitor Marques Honório

BAURU
2021

Cardoso, Fabrícia
Efeito de um gel de Proanthocianidina na degradação da matriz orgânica desmineralizada: análise perfilométrica e colagenolítica (ELISA)/ Fabrícia Cardoso. -- Bauru, 2021.
98 p. : il. ; 31 cm.

Tese (doutorado) -- Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, ano de defesa.

Orientador: Prof. Dr. Heitor Marques 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: 083076/2018
Data: 25/07/2018

ERRATA

FOLHA DE APROVAÇÃO

DEDICATÓRIA

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de bolsa de doutorado.

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) - PROCESSO 2018/05847-5, pelo financiamento desse estudo.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001 pelo apoio para realização do presente estudo.

“O universo sempre nos ajuda a lutar pelos nossos sonhos, por mais idiotas que possam ser. Porque são nossos sonhos, e só nós sabemos o quanto custa sonhá-los.”

Paulo Coelho

RESUMO

A matriz orgânica desmineralizada da dentina atua como uma barreira que dificulta a difusão dos ácidos para os tecidos adjacentes. Assim, visando prevenir a sua degradação, diversos veículos foram avaliados buscando inibir as MMPs, enzimas responsáveis por esta degradação. A proantocianidina parece ser capaz de inibir estas enzimas e, portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito protetor de um gel experimental à base de proantocianidina 10% sobre a dentina submetida à erosão e também na possível inibição da degradação da matriz orgânica desmineralizada (MOD). Os grupos avaliados foram: G1 - proantocianidina 10% (grupo teste 1), G2 - flúor 1,23% (controle positivo 1), G3 - clorexidina 0,012% (controle positivo 2) e G4 - placebo (controle negativo) e utilizou duas metodologias; perfilometria de contato e utilização do ICTP ELISA específico para MMPs. Para quantificar o desgaste de dentina, a perfilometria foi realizada. Os dados foram submetidos à Análise de Variância seguido do Teste LSD de Fisher ($p<0,05$). Para avaliar a degradação do colágeno da dentina desmineralizada, utilizou-se o ICTP ELISA. Os dados foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis seguido do Teste de Dunn ($p<0,05$). A análise mecânica (perfilometria) para avaliação do desgaste dentinário e também para a análise da espessura da matriz orgânica desmineralizada, o G1 apresentou desgaste significativamente menor quando comparado aos grupos G2, G3 e G4, que não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre si. Já na análise química da degradação da MOD (ICTP Elisa), G1 e o G4 não apresentaram diferença estatisticamente significativas entre si. O mesmo aconteceu entre G2 e G3. Contudo, G1 e G4 obtiveram menores valores de degradação de colágeno comparados aos grupos G2 e G3. Os resultados deste estudo mostraram que a proantocianidina 10% proporcionou menor desgaste dentário e diminuiu a degradação da matriz orgânica desmineralizada, sugerindo uma boa capacidade para prevenir a erosão dentária.

Palavras-chave: Dentina. Erosão. Proantocianidina. Desgaste dentário.

ABSTRACT

Effect of a Proanthocyanidin gel on the degradation of demineralized organic matrix: profilometry and collagenolytic analysis (ELISA)

The organic matrix is of great importance in the process of dental tissue loss because it works as a barrier that prevents the diffusion of acids into the tissues. To prevent its degradation, some agents have been tested in an attempt to inhibit MMPs, enzymes which are responsible for this process. Proanthocyanidin was shown to be efficient in inhibiting them and, therefore, the aim of this study was to evaluate the protective effect of an experimental gel based on 10% proanthocyanidin on dentin subjected to erosion and also in the possible inhibition of the degradation of the demineralized organic matrix (DOM). The tested groups were: G1 - 10% proanthocyanidin (test group 1), G2 - 1.23% fluorine (positive control 1), G3 - 0.012% chlorhexidine (positive control 2) and G4 - placebo (negative control) and two methodologies were used; contact profilometry and use of the specific ELISA kit for MMPs. To quantify dentin wear, profilometry was performed. Data were submitted to Analysis of Variance followed by Fisher's LSD Test ($p<0.05$). To assess the collagen degradation of demineralized dentin, ICTP ELISA was performed. Data were submitted to the Kruskal-Wallis test followed by the Dunn test ($p<0.05$). The mechanical analysis (profilometry) to assess dentin wear and also to analyze the thickness of the demineralized organic matrix, G1 showed significantly lower wear when compared to groups G2, G3 and G4, which did not show statistically significant difference between them. In the chemical analysis of DOM degradation (ICTP Elisa), G1 and G4 did not show statistically significant differences between them. The same happened between G2 and G3. However, G1 and G4 had lower values of collagen degradation compared to groups G2 and G3. The results of this study showed that 10% proanthocyanidin provided less tooth wear and decreased degradation of the demineralized organic matrix, suggesting a good ability to prevent tooth erosion.

Keywords: Dentin. Erosion. Proanthocyanidin. Dentin wear.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURAS

Figura 1 - Obtenção dos fragmentos de dentina para as duas metodologias propostas. 32

Figura 2 - Delineamento experimental da metodologia 1..... 33

Figura 3 - Esquema da análise de desgaste e da degradação da MOD 36

Figura 4 - Delineamento experimental da metodologia 2..... 37

Comentado [CdM1]: Esta figura também está na tese da Ana Paula? na sua? Na Tamires? Referencie, ok? Fui eu quem fez, mas depois que vai para uma tese o "dono" é o aluno. Então é melhor prevenir citando a fonte.

- GRÁFICOS

Gráfico 1 - Diagrama de dispersão representando correlação positiva, significativa e de moderada a forte. 45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Média (±dp) do desgaste da dentina (µm) dos grupos em estudo. ... 43

Tabela 2 - Média (±dp) da da espessura da matriz orgânica desmineralizada (µm) dos grupos em estudo. 44

Tabela 3 - Valores de mediana dos grupos em estudo. 44

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 13

2 REVISÃO DE LITERATURA.....19

3 PROPOSIÇÃO 27

4 MÉTODOS.....31

5 RESULTADOS 43

6 DISCUSSÃO 49

7 CONCLUSÕES 57

REFERÊNCIAS 61

APÊNDICE 75

ANEXOS.....95

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A dentina é constituída por 47% de componentes inorgânicos (apatita), 33% de componentes orgânicos e 20% de água. Os componentes orgânicos são compostos por 90% de colágeno tipo I e 10% de componentes não-colágenos: fosfoproteínas da dentina, proteoglinas e glicosaminaglicanas (SILVERSTONE; HICKS, 1985; PASHLEY *et al.*, 2004; MAGALHÃES *et al.*, 2009). Torna-se mais difícil a desmineralização da dentina exposta a agentes ácidos de origem intrínseca, extrínseca ou bacteriana conforme a quantidade de colágeno degradável aumenta, e por isso, é importante tentar preservá-lo. Isso faz com que a difusão de ácidos para o tecido seja dificultada, minimizando a erosão (KLONT e TEN CATE, 1991; KLETER *et al.,* 1994). Vale a pena salientar que a matriz orgânica pode ser degradada mecânica e quimicamente, fazendo com que haja uma progressão do desgaste da dentina (GANSS; KLIMEK; STARK 2004a; *HARA et al.,* 2005). Esta degradação química ocorre, devido a presença de enzimas denominadas metaloproteinases da matriz (MMPs), que podem ser ativadas pela quando o pH está abaixo de 4,5 (TJÄDERHANE *et al.*, 1998).

Além da desmineralização da dentina, a queda do pH expõe as fibrilas colágenas e ativa as MMPs que degradam esta matriz orgânica desmineralizada. Esse processo faz com que a perda de tecido dentinário progrida. Desta forma, o uso de inibidores de MMPs poderia reduzir tal mecanismo durante os desafios erosivos subsequentes, visto que a matriz orgânica funcionaria como uma camada protetora reduzindo a progressão da erosão (GANSS; KLIMEK; STARK 2004a). Diversos estudos comprovaram esse mecanismo de inibição, mostrando redução na progressão da erosão quando a clorexidina (CARRILHO *et al.*, 2007), o chá verde (KATO *et al.*, 2009) e outras substâncias (KATO *et al.*, 2010a) foram utilizadas como agentes inibidores de MMPs.

Atualmente, a proantocianidina (PA) tem chamado atenção dos pesquisadores como alternativa de agente inibidor de MMPs. Trata-se de um composto natural derivado de frutas, vegetais, castanhas, entre outros (HAN *et al.,* 2003) que possui menor toxicidade quando comparados com produtos sintéticos (SABINO *et al.*, 1999; YE *et al.*, 1999). Estudos têm mostrado que a PA apresenta uma grande afinidade

com proteínas ricas em prolina, como o colágeno, além de ser responsável por aumentar a capacidade das células em sintetizar colágeno (HAN *et al.*, 2003). Outros estudos caracterizaram o comportamento da PA sobre a dentina, evidenciando seus efeitos na interface de união resina-dentina. Nestes casos os, houve uma melhora significativa da adesão e das propriedades mecânicas, tornando as restaurações adesivas resistentes e duradouras (CASTELLAN *et al.*, 2010; 2011; 2013).

Recentemente, Cardoso *et al.* (2020) demonstraram em um estudo *in situ* que a PA consegue desempenhar um papel importante na prevenção da erosão após avaliar o efeito de um colutório sobre a dentina submetida à erosão. O colutório proporcionou valores de desgaste significativamente menores em relação ao placebo e o grupo controle.

Também já foi verificado que esse mesmo agente foi capaz de inativar mais de 89% do total de MMPs ativas, além de fortalecer a dentina desmineralizada o suficiente para minimizar o risco de colapso da rede de fibrilas de colágeno. Isso ocorre devido a capacidade de promover uma biomodificação da dentina, principalmente por induzirem ligações cruzadas no colágeno dentinário (XIE; BEDRAN-RUSSO; WU, 2008; CASTELLAN *et al.*, 2010; 2011, BEDRAN-RUSSO *et al.,* 2014). Por isso, é importante avaliar a ação desses agentes na dentina submetida à erosão e verificar a atuação deles diretamente no processo inibitório do desgaste dentinário e na degradação do colágeno.

Para determinar a degradação de colágeno, já foram testadas metodologias como perfilometria por contato e a análise de hidroxiprolina (BOTEON *et al.*, 2017). Este último método foi e ainda é bastante utilizado para determinação da degradação de colágeno (KATO *et al.*, 2010a), embora também seja contestada sua fidedignidade devido à subjetividade do método (SCHULUETER *et al.*, 2012). Outra alternativa para determinar a degradação de colágeno é a utilização do método ICTP ELISA específico para enzimas como MMPs e cisteína catepsinas (OSÓRIO *et al.*, 2011; TEZVERGIL-MUTLUAY; MUTLUAY; SESEOGULLARI-DIRIHAN, 2013). A vantagem desta abordagem indireta é que pode-se avaliar as atividades de protease total da matriz dentinária em seu estado de ligação natural e suas respostas a ativadores e inibidores (OSÓRIO *et al.*, 2011; TEZVERGIL-MUTLUAY; MUTLUAY; SESEOGULLARI-DIRIHAN, 2013).

Sendo assim, esse trabalho se propôs a avaliar o efeito da Proantocianidina 10% na forma de gel tópico para minimizar o desgaste da dentina submetida à erosão e para inibir a degradação da matriz orgânica da dentina desmineralizada através da perfilometria de contato e do método ICTP ELISA específico para MMPs.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

A cárie dentária, que há algumas décadas constitui uma das maiores preocupações dos cirurgiões-dentistas, tem mostrado diminuição na incidência em países desenvolvidos e subdesenvolvidos. Diante disso, lesões não cariosas têm se tornado mais evidentes, dentre elas, o desgaste dentário erosivo. (KILPATRICK, 2003; HUYSMAN; CHEW; ELLWOOD, 2011; MAHONEY; AL-ZAREA, 2012).

Pode-se classificar o desgaste dentário em atrição, abrasão e erosão (BARTLETT, 2006; GANSS, 2006; HARA; LUSSI; ZERO, 2006). A atrição é a perda de estrutura dentária causada pelo contato dos elementos dentários durante a deglutição, fonação e em casos de bruxismo. Abrasão ocorre quando forças mecânicas atuam levando à perda do tecido dentário sem qualquer relação com a oclusão. Exemplos de causas da abrasão são a técnica de escovação executada, tipo de escova utilizada e a presença de abrasivo nos dentifrícios (Eccles, 1982; Imfeld, 1996; MAGALHÃES *et al.*, 2009; RIOS *et al.*, 2006;2007; WEST, 2014).)

A erosão apresenta uma fisiopatologia mais complexa, caracterizada como desgaste crônico e químico, causado por ácidos sem envolvimento de microrganismos. O desafio ácido, que causa o amolecimento da superfície dentária, leva a uma perda de estrutura irreversível (LUSSI, 2006). A erosão pode ocorrer devido a mecanismos intrínsecos ou extrínsecos (LUSSI JAEGGI; ZERO, 2004; KAIDONIS, 2012; CARVALHO, 2014; LUSSI; GANSS, 2014).

Na erosão intrínseca, há a presença constante do suco gástrico na cavidade bucal. Esse quadro é comum em indivíduos que sofrem de refluxo gastroesofágico, anorexia, bulimia ou abuso do álcool (MAGALHÃES *et al.*, 2009). Nesse sentindo, outros fatores também devem ser considerados. São eles: condição do tecido dentário, propriedades da saliva, posição dos dentes no arco e anatomia dental.

Já foi demonstrando que a erosão dentária e o refluxo gastroesofágico estão diretamente relacionados após acompanharem os valores do pH do esôfago durante 24 horas (SCHROEDER *et al.,* 1995). A qualidade da saliva também exerce um papel importante nesse quadro clínico (HARA; LUSSI; ZERO, 2006), influenciando positiva ou negativamente para o surgimento da erosão. Em um estudo em que foi avaliado

seu pH durante 24 horas, notou-se que em indivíduos que apresentavam pH ácido por longo período de tempo, a saliva possuía baixa capacidade tampão, e, portanto, também apresentavam erosão dentária (GUDMUN- DSSON *et al.*, 1995).

Também é comum que pacientes com xerostomia apresentem este tipo de lesão, pois a saliva é fundamental para a formação da película adquirida. Hara, Lussi e Zero (2006) demonstraram seu importante papel para dificultar a permeabilidade dos ácidos, fazendo com que o contato com a superfície dentária tenha tempo reduzido e as chances de desenvolver a doença sejam menores.

Os ácidos extrínsecos também possuem relação direta com a erosão dentária (LUSSI *et al.*, 2004; LUSSI, 2006), principalmente devido a mudança de hábitos alimentares (ECCLES, 1979; MEURMAN; TEN CATE, 1996; NUNN, 1996; ZERO, 1996). É cada vez mais frequente a predileção por alimentos ácidos como sucos de frutas e/ou refrigerantes (LUSSI; JAEGGI; ZERO, 2004; LUSSI, 2006). Outro ponto importante é a maneira como esses alimentos têm sido consumidos. Já se sabe que quanto maior for o tempo que a bebida ácida estiver na cavidade bucal, maior será o seu tempo de contato com os elementos dentários e consequentemente maior será o risco desse indivíduo desenvolver lesões de erosão (LUSSI, 2009).

Algumas medidas preventivas podem ser adotadas para minimizar o processo de desgaste dentários. Entre elas, pode-se citar a diminuição na frequência de consumo de alimentos/bebidas ácidos (LUSSI, 2006; LUSSI; JAEGGI, 2006), o uso de canudos para ingerir bebidas ácidas (LUSSI, 2006; LUSSI; JAEGGI, 2006), uso de gomas de mascar para estimular o aumento do fluxo salivar (RIOS *et al.,* 2006) e a preferência pela ingestão de alimentos alcalinos e ricos em cálcio (leite, queijo) imediatamente após o consumo de alimentos com baixo pH (GEDÁLIA *et al.*, 1991; LEWINSTEIN; OFEK; GEDALIA, 1993).

Clinicamente, a característica mais comum da lesão por erosão é a perda de brilho do esmalte (SOBRAL *et al.,* 2000), superfície lisa e em forma de “U”. Também é fácil observar uma linha de esmalte intacto apenas ao redor da margem gengival. Já foi relatado que esse resquício de tecido permanece na região pois é protegido da ação dos ácidos devido a presença de placa remanescente. Conforme a doença avança, as concavidades no esmalte apresentam-se maior em largura do que em profundidade (LUSSI; JAEGGI, 2008). Já quando afeta a dentina, esta responde

positivamente aos testes de frio, calor e pressão osmótica (LEVITCH; BADER; SHUGARS, 1994).

Existem algumas diferenças em relação às faces dentárias que são acometidas pela erosão. As faces palatinas e oclusais dos dentes superiores, bem como as linguais e oclusais dos inferiores sofrem desgaste quando o ácido é de origem intrínseca. Em contrapartida, quando o ácido é de origem extrínseca as faces mais acometidas são as superfícies vestibulares (IMFELD, 1996; LITONJUA *et al.*, 2003).

Os danos causados pela erosão vão desde a perda irreversível de estrutura dentária até ao amolecimento do tecido causado pela desmineralização, tornando-a mais frágil a qualquer força mecânica atuante diretamente sobre ela, seja atrição, seja abrasão ou a combinação de ambas. Isso pode levar ao aumento do risco de agressão e destruição do tecido dentário (ATTIN *et al.,* 2001 a,b; ATTIN *et al.,* 2004; WIEGAND; KOWING; ATTIN, 2007).

Quando a doença atinge alto grau de severidade, além de expor a dentina, também pode acarretar hipersensibilidade dolorosa, ou seja, tal desmineralização tem como consequências a perda estética e a presença de dor (KATO *et al.,* 2009). Isso ocorre devido ao processo de desmineralização advindo de desafios erosivos. Inicialmente, a camada mais externa de matriz orgânica, que se encontra completamente desmineralizada, é exposta, seguida de uma zona parcialmente desmineralizada e por fim, ocorre a exposição da sua porção interna (KINNEY *et al.,* 1995).

Pensando em conservar a saúde bucal dos indivíduos, a prevenção e o acompanhamento das lesões de erosão tornam-se fundamentais e mais importantes do que os procedimentos restauradores em si (BARTLETT *et al.* 2005). Bartlett (2008) observou a progressão das lesões através do acompanhamento da longevidade de restaurações. Concluiu-se que boas alternativas para postergar a perda dos elementos dentários são diminuir a frequência com que os dentes são expostos aos desafios erosivos, utilizar dentifrícios fluoretados e lançar mão da aplicação de adesivos dentinários.

Porém, para que as medidas curativas e preventivas sejam efetivas de fato, é necessário conhecer a composição das diferentes estruturas envolvidas no processo

da alteração, que acomete tanto esmalte e dentina, bem como seu comportamento na evolução deste tipo de lesão.

O esmalte dentário é composto aproximadamente por 85% mineral, na forma de cristais de hidroxiapatita altamente substituíveis dispostos em primas, sendo o restante composto por proteínas e água. Em situações em que o pH encontra-se, abaixo de 4,5 esses cristais são facilmente solubilizados pelos ácidos, tornando a superfície dentária amolecida, o que resulta na perda de seu componente estrutural, caracterizando o desgaste dentário erosivo (RIOS et al., 2008; HONÓRIO et al., 2008;2010; BUZALAF et al., 2010; SIERPINSKA et al., 2013; LUSSI; GANSS, 2014).

Já dentina é composta por material inorgânico, orgânico e água. A matriz inorgânica é representada por cristais de hidroxiapatita substituíveis, com déficit em cálcio, fosfato, mas, ricos em magnésio e carbonato quando comparados à hidroxiapatita do esmalte (SILVERSTONE; HICKS, 1985). Estes cristais, situados entre e sobre as fibrilas colágenas, também se apresentam em tamanho menor quando comparados àqueles encontrados no esmalte dentário. Isso faz com que haja uma maior área de superfície, tornando-os mais suscetíveis aos desafios erosivos (SILVERSTONE; HICKS, 1985).

A matriz orgânica da dentina é composta por 90% de fibrilas colágenas (colágeno do tipo I) e os 10% restantes são compostos por fosfoproteínas da dentina, proteoglicanas e glicosaminoglicanas (SILVERSTONE; HICKS, 1985; PASHLEY *et al.*, 2004; MAGALHÃES *et al.,* 2009). As fibrilas colágenas diminuem a taxa de desmineralização quando presentes em maior quantidade, pois a presença de colágeno dificulta a difusão dos ácidos para o tecido, amenizando o processo de erosão (KLONT; TEN CATE, 1991; KLETER *et al.*, 1994). A dentina também contém enzimas denominadas metaloproteinases da matriz (MMPs) que são ativadas mediante queda do pH abaixo de 4,5. Porém, a degradação da matriz orgânica dentinária só é possível após a neutralização do pH, visto que, embora estas enzimas sejam ativadas em pH ácido, elas só terão capacidade de degradar a matriz da dentina quando o pH estiver neutro (TJÄDERHANE *et al.*, 1998; STROBEL; HELLWIG, 2015).

Além da desmineralização da dentina, a queda o pH expõe as fibrilas colágenas e ativa as MMPs que degradam a matriz orgânica desmineralizada. Esse processo faz com que a perda de tecido dentinário progrida. Desta forma, o uso de inibidores de

MMPs poderia reduzir tal mecanismo durante os desafios erosivos subsequentes, visto que a matriz orgânica funcionaria como uma camada protetora reduzindo a progressão da erosão. A Clorexidina e do chá verde têm sido bem sucedidos na inibição das MMPs, atuando na redução da degradação da matriz colágena (HEBLING *et al.,* 2005; CARRILHO *et al*., 2007).

O chá verde também demonstrou ser eficaz na redução do desgaste da dentina em desafios erosivas e/ou abrasivas (KATO *et al.*, 2009). Foi adicionado a um gel de aplicação tópica o extrato de chá verde, epigalocatequina 3 - galato (EGCg), o qual demonstrou ter capacidade de reduzir o desgaste em dentina de forma significativamente maior, em comparação com o fluoreto (KATO *et al.*, 2010a). Além disso, por se tratar de um inibidor de MMPs, tal extrato conduziu a concentrações significativamente mais baixas de hidroxiprolina quando comparados com os outros tratamentos, comprovando seu efeito preventivo na erosão dentinária[34].

Outros estudos demonstraram que o sulfato ferroso apresenta um potencial preventivo da erosão em dentina, pois quando adicionado a bebidas à base de cola na intenção de reduzir o efeito erosivo das mesmas, o sulfato ferroso obteve melhores resultados no substrato dentinário (KATO *et al.*, 2010a). Também é considerado um inibidor de MMPs, principalmente 2 e 9, além de impedir o desgaste em dentina (KATO *et al.*, 2010b).

Em pesquisas sobre cárie dentária e doença periodontal, alguns benefícios advindos dos polifenóis do suco de *Cranberry* (Vaccinium macrocarpon) ou extraídos da própria fruta têm sido cientificamente comprovados. O EGCg e as Proantocianidinas (PA), passaram a ser alvos de estudos, pois apresentam capacidade de reduzir a resposta inflamatória, bem como a inibição da produção e atividade das MMPs. que favorecem a destruição da matriz extracelular na doença periodontal (LA; HOWELL; GRENIER, 2009; BONIFAIT; GRENIER, 2010). Outros estudos têm demonstrado propriedades benéficas para o tratamento e prevenção de cárie e doença periodontal (FEGHALI *et al.,* 2012; GAZZANI; DAGLIA; PAPETTI, 2012) que estariam provavelmente relacionadas à inibição da produção e atividade de metaloproteinases da matriz (LA; HOWELL; GRENIER, 2009; DÉZIEL *et al.*, 2010; EPASINGUE *et al.,* 2013). Baseando-se na capacidade de inibir as MMPs, estendeu-se a possibilidade deste efeito para o tecido dentinário, visando a manutenção da

Comentado [CdM2]: Coloque referências para esta frase.

matriz de colágeno, já que esta é de suma importância para minimizar o processo de erosão.

A proantocianidina (PA), que apresenta como subunidade flavan 3 – ol ligada à C4-C6 (C8), é um composto natural derivado de frutas, vegetais, castanhas, entre outros (HAN *et al.,* 2003; KENNEDY; TAYLOR, 2003). Trabalhos têm verificado que a PA apresenta uma grande afinidade com proteínas ricas em prolina (como o colágeno) além de ser responsável por aumentar a capacidade das células em sintetizar colágeno (HAN *et al.,* 2003).

Outros estudos demonstraram uma melhora significativa da adesão e das propriedades mecânicas na interface de união resina-dentina, tornando as restaurações adesivas resistentes e duradouras (CASTTELAN *et al.,* 2010; 2011, 2013). Foi demonstrado também, que as colagenases não tiveram efeito na dentina tratada com os agentes ricos em PA, sugerindo seu efeito inibitório sobre enzimas que degradam a matriz dentinária (CASTTELAN *et al*., 2010).

Recentemente, Cardoso *et al.* (2020) demonstraram em um estudo *in situ* que a PA consegue desempenhar um papel importante na prevenção da erosão após avaliar o efeito de um colutório sobre a dentina submetida à erosão. O colutório proporcionou valores de desgaste significativamente menores em relação ao placebo e o grupo controle.

Também já foi verificado que a PA foi capaz de inativar mais de 89% do total de MMPs ativas, além de fortalecer a dentina desmineralizada o suficiente para minimizar o risco de colapso da rede de fibrilas de colágeno (SCHEFFEL *et al.,* 2014).

À vista disso, apesar da crescente preocupação pela erosão dentária e sua busca por soluções, há necessidade de exploração e aprofundamento sobre os agentes terapêuticos com efeitos inibitórios de MMPs como a Proantocianidina, para prevenir a progressão do desgaste dentário.

3 PROPOSIÇÃO

3 PROPOSIÇÃO

Este estudo se propôs a avaliar o efeito da Proantocianidina 10% na forma de gel tópico na minimização do desgaste da dentina submetida à erosão e na inibição da degradação da matriz orgânica da dentina desmineralizada através da perfilometria de contato e do ICTP ELISA específico para MMPs.

4 MÉTODOS

4 MÉTODOS

O presente estudo submetido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Bauru – Universidade de São Paulo e possui CAAE: 94400218.8.0000.5417 (anexo 1).

Delineamento experimental

Quarenta molares humanos extraídos foram utilizados neste estudo. Tais dentes foram obtidos através da doação do cirurgião-dentista que atua como autônomo e que preencheu adequadamente um termo de cessão (anexo 2). Destes, foram obtidos espécimes de dentina coronária avaliados por meio de um único fator de estudo (fator grupo em 4 níveis). Os grupos de estudo foram:

- **G1-** espécimes tratados com gel de Proantocianidina 10% (grupo teste 1);
- **G2-** espécimes tratados com gel de Flúor 1,23% (controle positivo 1);
- **G3-** espécimes tratados com gel de Clorexidina 0,012% (controle positivo 2);
- **G4-** espécimes tratados com gel placebo (controle negativo).

Foram utilizadas neste estudo 2 metodologias: análise do desgaste por perfilometria de contato (Metodologia 1) utilizando 40 espécimes de dentina (4 x 4 x 2 mm) e análise da degradação do colágeno pela determinação da quantidade de colágeno tipo I solubilizado utilizando o método ICTP ELISA (Metodologia 2) utilizando outros 40 espécimes de dentina (6 x 2 x 1 mm), mas provenientes dos mesmos dentes da metodologia 1 (Figura 1).

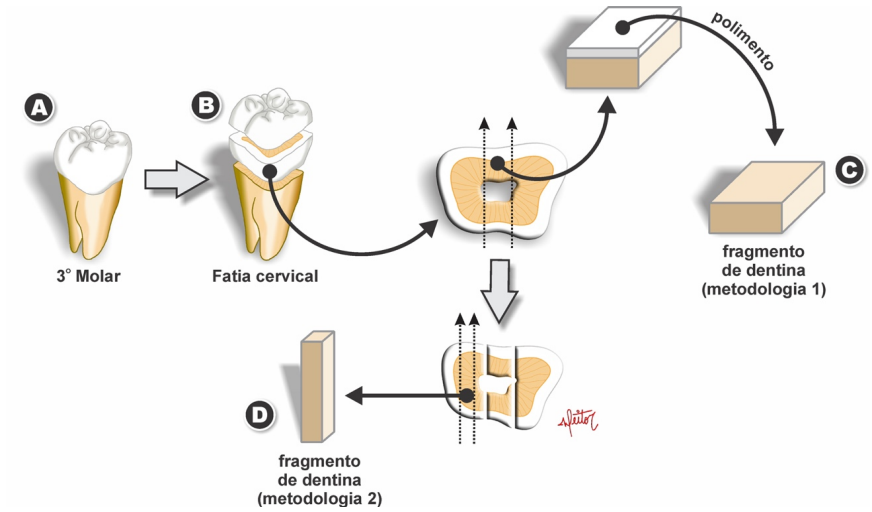

Figura 1- Obtenção dos fragmentos de dentina para as duas metodologias propostas.

METODOLOGIA 1:

A figura 2 apresenta o delineamento experimental da metodologia 1.

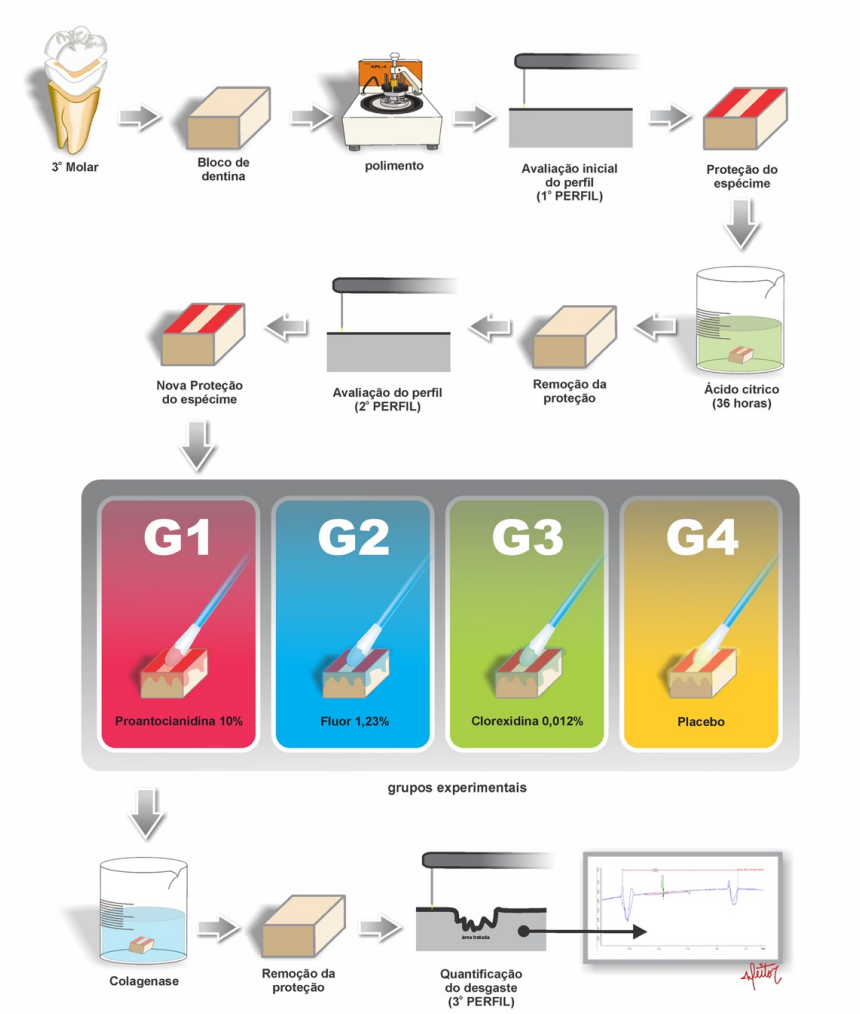

Figura 2 - Delineamento experimental da metodologia 1.

Preparo das amostras de dentina

Para as análises, foram necessários ao todo 40 espécimes de dentina, os quais foram preparados a partir de fatias da coroa de terceiros molares humanos extraídos. As coroas foram separadas das raízes com a utilização de uma máquina de corte (ISOMET 1000, Buehler. Lake Bluff- IL, EUA) e um disco diamantado. Blocos de dentina (4 x 4 x 2 mm) foram cortados da região cervical coronária sob constante refrigeração de água (para evitar aquecimento e possível degradação proteica) e a planificação para completa remoção do esmalte e para polir a amostra foi feita com auxílio de uma sequência de lixas (320, 600 e 1200 de granulação de Al_2O_3, Buehler), removendo em torno de 200 micrometros de superfície dentária. Finalmente, os espécimes foram polidos com um disco de feltro umedecido por uma solução diamantada (1µm, Buehler) com auxílio de uma politriz metalográfica (ECOMET 30, Buehler. Lake Bluff- IL, EUA). Após o polimento, os espécimes foram limpos com utilização de banho em ultrassom (T7 Thornton, Unique Ind. e Com. Ltda., São Paulo, Brasil) por 2 minutos. Os espécimes foram fixados em blocos acrílicos e randomizados em 4 grupos, os quais se diferenciaram pelo gel de tratamento. Para estabelecer uma superfície de referência para determinar o grau da lesão, dois terços da superfície exposta dos espécimes foram cobertas com duas camadas de esmalte de unha, criando assim duas áreas controles nos dois terços laterais da superfície, e assim deixando uma área central sem proteção.

Perfilometria Inicial

Para a avaliação do perfil inicial dos espécimes de dentina, foi utilizado o perfilômetro da marca Mahr (Marsurf GD 25, Göttingen, Germany) acoplado à um microcomputador, na qual foi utilizado o software (Marsurf XCR 20) para avaliação das imagens.

Para tal, uma ponta apalpadora esférica, percorreu a superfície, acoplada a uma unidade que teve como função processar e interagir as informações quantitativamente, fornecendo os resultados. Para cada espécime foi realizado um total de três leituras. A ponta apalpadora percorreu 3 milímetros em todas as leituras

realizadas no espécime e a distância de uma leitura a outra foi padronizada em 250 micrometros.

Os espécimes foram fixados a um dispositivo de padronização da posição e as medidas que determinaram a sua localização foram registradas para permitir a sua recolocação exata após as etapas experimentais laboratoriais, possibilitando assim a realização de novas análises perfilométricas na mesma localização. Em cada espécime foram feitas 3 leituras a uma distância pré-determinada de 1,75; 1,5 e 1,25 micrometros do espécime em relação a posição da ponta avaliadora. Em seguida, os gráficos dos perfis oriundos do percurso da ponta sobre o espécime foram salvos individualmente e, posteriormente sobrepostos e analisados. Após esta análise inicial do perfil, as regiões de controle (extremidades do espécime) foram protegidas com esmalte de unha.

Tratamento dos espécimes

Os blocos de dentina foram desmineralizados por imersão em ácido cítrico 0,87 M, pH 2,3 (36 horas a 4°C). Em seguida, as amostras foram completamente enxaguadas em água deionizada (30 segundos). O excesso de água foi removido com papel absorvente. Após a desmineralização, o esmalte de unha foi removido e três análises perfilométricas foram realizadas novamente nos mesmos locais que as medições da linha de base. Em sequência, o esmalte de unha foi aplicado novamente e os espécimes foram alocados aleatoriamente em 4 grupos, de acordo com o gel de tratamento.

O gel foi aplicado sobre a dentina com microbrush durante 1 minuto (KATO *et al.*, 2010a; KATO *et al.,* 2012; BOTEON *et al.,* 2017) e teve seu excesso removido com cotonete. Todas as formulações dos géis foram as mesmas (hidrocelulose, propilenoglicol, metilparabeno, imidazolidiniluréia e água deionizada), exceto pelo princípio ativo (KATO *et al.,* 2010a). Os espécimes foram submetidos a degradação de colágeno pela ação de colagenase obtida de Clostridium histolyticum (Tipo VII, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) adicionada em saliva artificial (20 mmol / L de HEPES, 0,70 mmol / L $CaCl_2$, 0,20 mmol / L de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 4 mmol / L de KH_2PO_4, 30 mmol / L de KCl, 0,30 mmol / L de NaN_3) a uma concentração de 100 U / mL, durante 96 horas (37 ° C), sem renovação (GANSS *et al.,* 2004b).

Após esse período, o esmalte de unha foi removido e a terceira, e última, perfilometria foi realizada.

Análise do desgaste

O perfil traçado pelo perfilômetro percorreu a superfície dos espécimes passando por áreas de superfície hígida (protegida) e afetada, e como o espécime polido não tratado (protegido – área de referência) se assemelha muito a uma linha reta, foi simples a identificação da região submetida aos grupos experimentais.

Assim sendo, após a determinação dos perfis, a medida do desgaste foi obtida pela distância em micrometros entre a linha média do gráfico correspondente á área protegida do espécime (superfície de referência) e a linha média referente à área desgastada. No caso deste estudo, o desgaste da dentina foi obtido pela sobreposição do perfil final e o perfil inicial através do software (marsurf XCR 20).

Determinação da espessura da matriz orgânica desmineralizada (MOD) através da perfilometria

Como foi realizada uma perfilometria intermediária (pós-desmineralização com ácido cítrico), foi possível estimar a camada de colágeno que foi degradada a partir da perfilometria. Para isso, foi feita a sobreposição dos perfis inicial e intermediário, além do inicial x final e com estes valores em mãos foi calculada a diferença, que resulta na camada de colágeno que foi degradada (Figura 3).

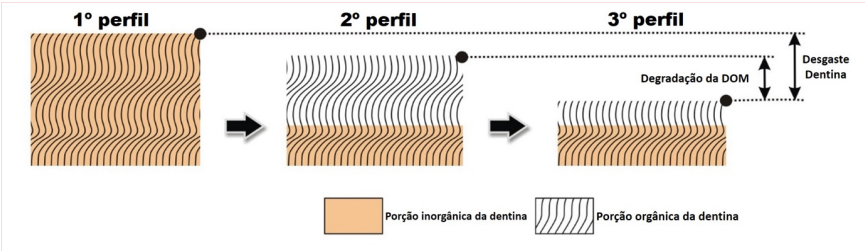

Figura 3 – Esquema da análise de desgaste e da degradação da MOD

Comentado [CdM3]: Esta figura também está na tese da Ana Paula? na sua? Na Tamires? Referencie, ok? Fui eu quem fez, mas depois que vai para uma tese o "dono" é o aluno. Então é melhor prevenir citando a fonte.

METODOLOGIA 2:

A figura 4 apresenta o delineamento experimental da metodologia 2.

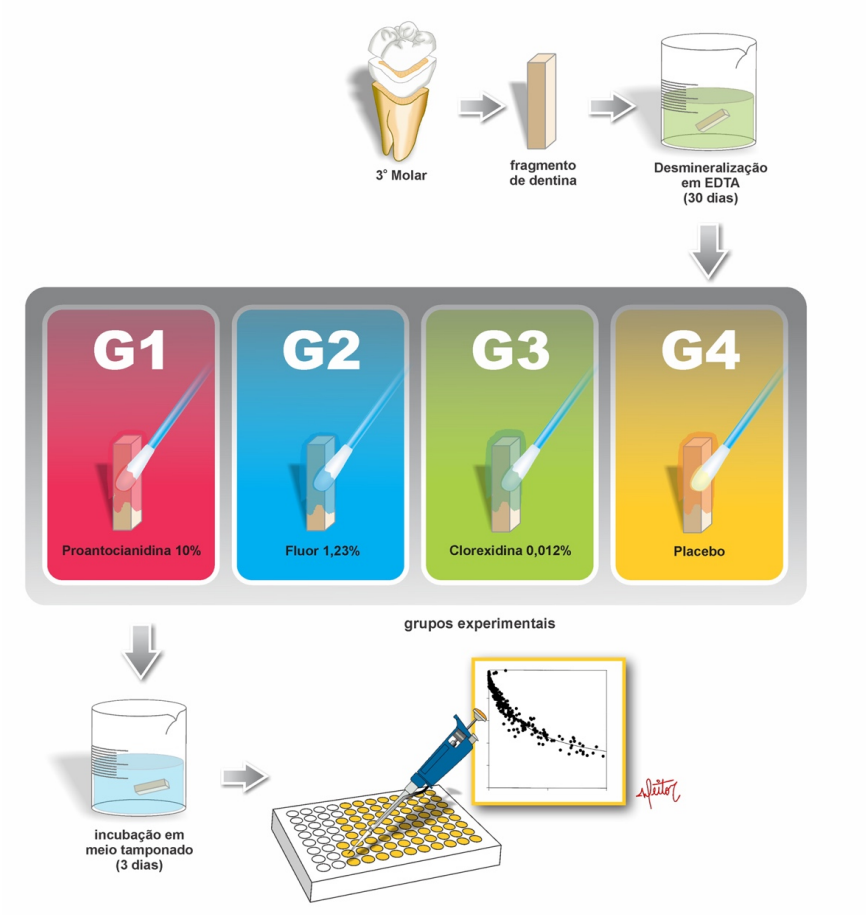

Figura 4- Delineamento experimental da metodologia 2.

Avaliação de Proteases Endógenas Vinculadas em Matriz em Dentina Desmineralizada

Nesta etapa da pesquisa foi utilizada dentina coronária dos mesmos dentes que forneceram espécimes de dentina para a perfilometria do subprojeto 1. Palitos de dentina com 6 mm x 2 mm x 1mm de dimensão foram seccionados da porção médio coronal (Figura 1). Os palitos foram completamente desmineralizados em 0,5 M EDTA (pH 7,4; Sigma, St. Louis, EUA) por 30 dias a 4°C. A cada quatro dias, a solução de EDTA foi trocada por uma nova. Os espécimes foram então lavados com água deionizada a 4°C por 72 horas para completa remoção dos resíduos de EDTA, assim evitando uma possível inibição das MMPs.

Tratamento das amostras de dentina

Foram utilizados 10 espécimes de dentina a cada um dos 4 grupos (os mesmos utilizados na metodologia 1. Os géis foram aplicados sobre a dentina com microbrush durante 1 minuto (KATO *et al.,* 2010a; KATO *et al.,* 2012; BOTEON *et al.,* 2017) e tiveram seus excessos removidos com cotonete. Todas as formulações dos géis foram as mesmas (hidrocelulose, propilenoglicol, metilparabeno, imidazolidiniluréia e água deionizada), exceto pelo princípio ativo (KATO *et al.,* 2010a).

Os espécimes de todos os grupos foram imersos em 0,5 mL de um meio tamponado composto de 5 mM de HEPES, 2.5 mM de $CaCl_2.H_2O$, 0,05 mM de $ZnCl_2$ e 120 mM de NaCl ajustado a pH 7,4. Os tubos selados foram incubados num banho agitador de água a 37°C durante 3 dias. Todos os 0,5 mL do meio foram removidos após 3 dias. As alíquotas de 10 a 20 µL do meio de incubação foram utilizadas para medir fragmentos de colágeno de ICTP.

Avaliação da degradação da matriz dentinária

A degradação da matriz por MMPs foi determinada pela medição da quantidade de telopeptídeos C-terminais de colágeno solubilizado tipo I (ICTP) (GARNERO *et al.,* 2003; OSORIO *et al*., 2011) religados ao longo dos períodos de incubação de 3 dias, usando o método ICTP ELISA (Human Cross-linked Carboxy-terminal telopeptide of

type I collagen, Southern California, San Diego - USA). A única fonte de fragmentos de telopeptídeos de ICTP em zonas mineralizadas é atribuída à atividade de telopeptidase de MMPs (GARNERO *et al.,* 2003; OSORIO *et al*., 2011).

Análise estatística

Os dados quantitativos foram inicialmente analisados pelo teste de Normalidade (Teste de Shapiro-Wilks) e pelo teste de Homogenidade das variâncias (Teste de Levene). Caso atendessem a estes dois pressupostos, os dados seriam comparados por um teste paramétrico (ANOVA) e caso não atendessem a ao menos um destes pressupostos, o teste a ser utilizado seria o Teste de Kruskal-Wallis (não paramétrico).

Para a análise do desgaste dentinário e análise da espessura da matriz orgânica desmineralizada (MOD), os dados atenderam aos pressupostos iniciais e foram submetidos à Análise de Variância seguida do teste LSD de Fisher ($p<0,05$).

Para a Avaliação de Proteases Endógenas Vinculadas em Matriz em Dentina Desmineralizada, não houve distribuição normal dos dados e estes foram submetidos ao Teste de Kruskal-Wallis seguido do Teste de Dunn ($p<0,05$).

A regressão linear simples e o teste de correlação de Pearson foram realizados para avaliar se a matriz orgânica desmineralizada degradada avaliada por perfilometria é um bom preditor para a degradação do colágeno avaliada pelo ICTP ELISA.

Para a realização destas análises estatísticas, foi utilizado o programa STATISTICA data analysis software system 11.0 (Stat Soft Inc.).

5 RESULTADOS

5 RESULTADOS

Análise do desgaste dentinário

A tabela 1 apresenta os dados de desgaste dentinário avaliado por perfilometria. Os dados mostraram que não houve diferença significativa de desgaste da dentina entre os grupos G2 (flúor 1,23% - controle positivo 1), G3 (clorexidina 0,012% - controle positivo 2) e (G4 - gel placebo). Porém, os mesmos apresentaram maior desgaste dentinário quando comparados ao grupo tratado com gel de PA 10% (G1).

Tabela 1 - Média (±dp) do desgaste da dentina (µm) dos grupos em estudo.

GRUPO	DESGASTE (média ± dp)
G1- PA 10%	156,0 ± 96,8[a]
G2- Flúor 1,23%	255,0 ± 89,5[b]
G3- Clorexidina 0,012%	2,93,0 ± 53,0[b]
G4- Placebo	270,0 ± 55,6[b]

*Valores de medias seguidos de letras distintas apresentam diferença estatística significativa entre os grupos (ANOVA seguido do teste de LSD de Fisher; $p<0,05$).

Análise da espessura da matriz orgânica desmineralizada (MOD)

A tabela 2 apresenta os dados espessura da matriz orgânica desmineralizada avaliada por perfilometria. Os dados mostraram que não houve diferença significativa de desgaste da dentina entre os grupos G2 (flúor 1,23% - controle positivo 1, G3 (clorexidina 0,012% - controle positivo 2) e (G4 - gel placebo). Porém, estes três apresentaram maior desgaste dentinário quando comparados ao grupo G1.

Tabela 2 - Média (±dp) da da espessura da matriz orgânica desmineralizada (µm) dos grupos em estudo.

GRUPO	DESGASTE (média ± dp)
G1- PA 10%	4,9 ± 119,0[a]
G2- Flúor 1,23%	99,0 ± 118,0[b]
G3- Clorexidina 0,012%	144,0 ± 63,2[b]
G4- Placebo	83,9 ± 50,8[b]

*Valores de medias seguidos de letras distintas apresentam diferença estatística significativa entre os grupos (ANOVA seguido do teste de LSD de Fisher; $p<0,05$).

Avaliação de Proteases Endógenas Vinculadas em Matriz em Dentina Desmineralizada

A tabela 3 apresenta os dados de degradação de MOD avaliado por ICTP ELISA. Os dados mostraram que não houve diferença significativa entre os grupos G2 e G4 que obtiveram menores valores de degradação de colágeno apresentando diferença estatisticamente significativa quando comparados aos grupos G2 e G3 que não apresentaram diferenças significativas entre si.

Tabela 3 - Valores de mediana dos grupos em estudo.

GRUPO	MEDIANA (intervalo interquartil)	25%	75%
G1- PA 10%	7,0[a]	4,3	8,0
G2- Flúor 1,23%	147,0[b]	16,8	445,0
G3- Clorexidina 0,012%	278,0[b]	126,0	389,0
G4- Placebo	48,0[a]	11,0	108,0

*Valores de medias seguidos de letras distintas apresentam diferença estatística significativa entre os grupos (Teste de Kruskal-Wallis seguido do Teste de Dunn; $p<0,05$).

Para determinar a correlação entre os métodos de avaliação, perfilometria e ICTP ELISA, foi feito teste de Shapiro-Wilk para verificar se houve normalidade dos resíduos seguido do teste de Coeficiente de Correlação de Pearson.

Foi realizada a análise de regressão linear simples em que a variável preditora (ou variável independente) foi a MOD degradada e a variável dependente foi a

degradação de colágeno avaliada pelo método ICTP ELISA. Para isso, utilizou-se a equação de regressão: Y (ICTP/ELISA) = 0,0497 (coeficiente linear) + beta (0,000793) x MOD degradada.

O Gráfico 1 representa o diagrama de dispersão mostrando que existe uma correlação positiva, significativa e de moderada para forte (0,55) onde a MOD degradada é um preditor significativo pra explicar os valores obtidos através do ICTP ELISA.

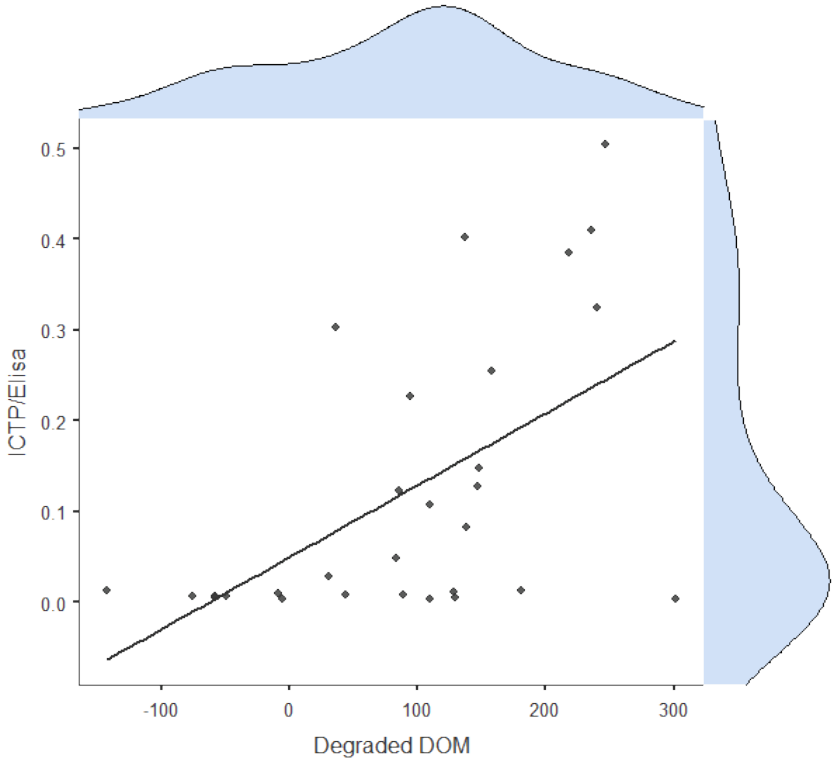

Gráfico 1 - Diagrama de dispersão representando correlação positiva, significativa e de moderada a forte.

6 DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Com o avanço da odontologia, o tratamento das condições bucais tem evoluído e cada vez mais novos materiais podem ser utilizados com embasamento cientifico na rotina clínica.

Uma das vantagens desse avanço é a diminuição da incidência de cárie dentária no cenário atual. Como esta doença tem se tornado menos frequente, o cirurgião dentista pôde observar outras lesões, como as de erosão dentária, que são de fácil diagnóstico durante o exame clínico intraoral (PETERSON; BRATTHALL, 1996; BRANCO *et al.*, 2008).

A erosão dentária (perimólise) é a perda progressiva e irreversível de tecido dentário duro devido a ação direta de agentes ácidos, mas sem envolvimento bacteriano (MAY *et al.,* 2003; TRUIN *et al.,* 2005; MAGALHÃES *et al.,* 2008; SERRA *et al.,* 2009). Essa doença pode ser causada pela junção de diversos fatores que vão tornar o indivíduo mais predisposto a desenvolvê-la, como a ação de substâncias químicas, biológicas, nível sócioeconômico e comportamento do indivíduo, assim como o tipo de dieta e maneira como costuma deglutir os alimentos (FERREIRA, 2006; LUSSI, 2006; LUSSI; JAEGGI, 2008; FERREIRA *et al.,* 2009).

As lesões produzidas pela erosão dentária são irreversíveis e possivelmente levarão ao comprometimento estético e funcional dos elementos dentários (MEURMAN; TOSKALA; NUUTINEN, 1994; SCHROEDER; FILLER; RAMIREZ, 1995; ALI; BROWN; RODRIGUEZ, 2002; AW; LEPE; JOHNSON, 2002; GRIPPO; SIMRING; SCHREINER, 2004; ABRAHAMSEN, 2005; ADDY, 2005; BARTLETT, 2008). Os ácidos envolvidos nesse processo podem ter origem extrínseca ou intrínseca, sendo que os de origem extrínsecas são provenientes principalmente da dieta, enquanto que os ácidos de causas intrínsecas advêm de refluxo gastroesofágico e de distúrbios alimentares como a bulimia nervosa (SCHROEDER; FILLER; RAMIREZ, 1995; BARTLETT; EVANS; ANGGIANSAH, 2000; ALI; BROWN; RODRIGUEZ, 2002; GRIPPO; SIMRING; SCHREINER, 2004; BARTLETT, 2005; ABRAHAMSEN, 2005; BARTLETT, 2008).

Clinicamente, os elementos dentários acometidos pela erosão apresentam sensibilidade ao frio, calor e pressão osmótica. Também ocorre a perda dos contornos anatômicos normais dos dentes devido à presença constante do agente erosivo. Também por este motivo, os dentes não apresentam extrínsecas. Quando restaurados, as restaurações se tornam mais salientes e elevadas que a superfície do dentária.

Comentado [CdM4]: Não entedi?? Apresentam o quê extrínsecas??

Assim que confirmado o diagnósitco, o cirurgião dentista deve focar o tratamento na possível sintomatologia do paciente e também em controlar o agravamento das lesões (GANDARA; TRUELOVE, 1999; NASSIF *et al.,* 2004; BRANCO *et al.,* 2008). Em casos que ocorre uma significativa perda da estrutura dentária, fazendo com que haja comprometimento estético e funcional, o tratamento mais indicado é o restaurador (LITONJUA *et al.*, 2003). É fundamental que o paciente esteja ciente de todos os riscos e danos que o processo de erosão acarreta para que seja colaborativo em minimizar a evolução da doença. Somente depois dessa etapa é que o tratamento restaurador deve ser realizado (VASCONCELOS; VIEIRA; COLARES, 2010).

Se as lesões de erosão não forem corretamente tratadas, o paciente poderá apresentar déficit na fala, mastigação ineficiente e oclusão prejudicada. Além disso, poderá apresentar hipersensibilidade dentinária e possível exposição pulpar. O agravamento da doença também pode levar ao surgimento de diastemas, perda de dimensão vertical e a bordas incisais podem se apresentar finas e/ou fraturadas. O tratamento vai ser realizado de acordo com a presença dos fatores etiológicos detectados através de anamnese e exame clínico.

Além disso, a exposição constante de MOD faz com que haja a perda progressiva de tecido dentinário. Assim, o uso de inibidores de MMP poderia reduzir esse mecanismo durante os desafios de erosão subsequentes, pois a matriz orgânica funcionaria como uma camada protetora, reduzindo a progressão da erosão (KLONT; TEN CATE, 1991; KLETER *et al*., 1994). Nesse contexto, a clorexidina e o flúor têm demonstrado capacidade de inibir a degradação do colágeno e inibir as MMPs (CARRILHO *et al*., 2007; KATO *et al.,* 2012; KATO *et al.,* 2014), por isso foram utilizados como controle positivo. Por outro lado, a clorexidina tem efeitos colaterais indesejáveis como manchas nos dentes, perda do paladar e úlcera de mucosa

(GUIMARÃES *et al.,* 2006). Portanto, pode não ser uma boa estratégia a ser usada em longo prazo.

Produtos naturais, como a PA, são cada vez mais destinados ao desenvolvimento de produtos para a saúde bucal, pois, a princípio, envolvem menor incidência de efeitos colaterais (XIE; BEDRAN-RUSSO; WU, 2008). Estudos anteriores demonstraram o efeito protetor dessa substância sobre a erosão dentinária (CARDOSO *et al.,* 2020; BOTEON *et al*., 2017) e, neste estudo, o grupo tratado com PA também obteve os melhores resultados. Assim sendo, como a ela não causa os mesmos efeitos colaterais da clorexidina, seu uso pode ser mais vantajoso para a prevenção da erosão em dentina.

A espessura da MOD foi estimada calculando a diferença entre o nível da superfície após a degradação do colágeno (3ª medida) e o nível da superfície após a desmineralização (2ª medida), semelhante ao realizado por SCHLUETER *et al.* (2012). Portanto, cada bloco de dentina foi posicionado corretamente na perfilometria durante três medidas (ATTIN; WEGEHAUPT, 2014). Além disso, a dentina foi mantida sob condições úmidas para evitar o encolhimento da matriz de colágeno (ATIN *et al.*, 2009).

Na segunda medida, após a desmineralização, o desgaste em média foi baixo apesar do desafio (ácido cítrico, pH 2,3, 36 h). Esse fato mostra que provavelmente foi aferida por profilometria a matriz de colágeno, pois as condições de umidade foram mantidas (GANSS *et al.* 2009a). Porém, após tratamento e imersão em saliva artificial com colagenase o desgaste exato foi revelado. O grupo que apresentou resultados mais elevados foi o da PA com valores mais elevados, diferentemente do que ocorreu com os chamados bons agentes NaF e clorexidina. Esses resultados indicam que a PA parece ter capacidade de inibir as enzimas colagenolíticase, por isso, a MOD foi preservada mesmo após a ação da colagenase. Isso pode ser devido à manutenção da própria MOD ou à sua ação no processo de des- e remineralização (BUZALAF; MAGALHÃES; WIEGAND, 2009).

Alguns estudos mostraram que agentes com alto teor de flúor são mais eficazes na prevenção da erosão dentária (GANSS *et al.*, 2001; LAGERWEIJ *et al.*, 2006; MAGALHÃES *et al.,* 2009), pois eles têm a capacidade de promover a formação de uma camada ácido resistente rica em metal ou de uma camada de fluoreto de cálcio que fornece proteção temporária contra desafios erosivos (GANSS *et al.*, 2001;

LAGERWEIJ *et al.*, 2006; MAGALHÃES *et al.,* 2009). Neste estudo, o grupo NaF não apresentou diferença estatística em relação ao grupo placebo. Esse achado é semelhante ao encontrado por Kato *et al.*, (2010a) e Boteon *et al.* (2017). Esses resultados podem ser devido à variável de resposta usada nesses estudos, que é o desgaste da dentina ao invés de uma análise direta da capacidade de inibição dos diferentes géis na degradação do colágeno.

Neste estudo, os resultados da proantocianidina foram melhores do que os outros grupos. Estudos mostram que a proantocianidina atua positivamente nos processos de des-remineralização e seu mecanismo remineralizador parece ser diferente do flúor (XIE; BEDRAN-RUSSO; WU, 2008). No presente estudo, provavelmente a PA tenha melhorado a MOD por sua capacidade de induzir ligações cruzadas no colágeno da dentina e reforçar a matriz de colágeno remanescente (HAN *et al.*, 2003; XIE; BEDRAN-RUSSO; WU, 2008; CASTELAN *et al.,* 2010; CASTELAN *et al.,* 2011; BEDRAN-RUSSO *et al.*, 2014). A resistência que as fibrilas de colágeno apresentam depende diretamente da quantidade de formação de ligações cruzadas endógenas e exógenas (GOH *et al.*, 2007). Para que ocorram as ligações cruzadas endógenas, o telopeptídeo deve se ligar com os domínios helicoidais adjacentes das moléculas de colágeno tipo I. Nas ligações cruzadas exógenas, a PA atua diretamente no colágeno induzindo ao aumento de ligações cruzadas entre hidrogênio e a proteína amida carbonila e a hidroxila fenólica (HAGERMAN; KLUCHER, 1986). Também promove ligações covalentes e hidrofóbicas. Tais ligações cruzadas proporcionam uma estabilidade maior quando comparadas a outros polifenóis, o que sugere sua especificidade de estrutura (HAGERMAN; BUTLER, 1981), que embora promova a ligação de hidrogênio também cria bolsas hidrofóbicas HAN *et al.*, 2003).

Na análise perfilométrica os grupos da Clorexidina, flúor e placebo apresentaram resultados inferiores aos do grupo PA, enquanto na análise química da degradação do colágeno realizada pelo ICTP ELISA, o grupo PA não apresentou diferença significativa com o grupo placebo. Isso pode estar diretamente relacionado ao agente desmineralizador escolhido. O ácido cítrico promove a desmineralização da dentina e, neste caso, causa uma grande perda da estrutura dentária, o que dificulta a análise da perfilometria exata dos espécimes. Além disso, na análise da degradação do colágeno realizada com o ICTP ELISA, houve uma grande perda de amostra. Esses fatores podem estar relacionados ao longo tempo de armazenamento dos

dentes antes de seu uso. Apesar disso, notou-se que tanto a perda da estrutura dentária quanto a dificuldade de detecção do colágeno degradado foram equivalentes em todos os grupos, o que nos permitiu manter a comparação entre os espécimes. Outra possível razão para o desempenho do desempenho da proantocianidina é a concentração utilizada no presente estudo (10%). Estudos mostraram bons resultados em concentrações de proantocianidina inferiores a 10% e seu efeito dose-resposta (BEDRAN-RUSSO *et al.*, 2008).

Apenas a análise perfilométrica sobre dentina erodida não reflete a perda mineral, uma vez que há interferência da matriz de colágeno (GANSS *et al.,* 2009a). Além disso, os perfilômetros de contato usam uma agulha com ponta de diamante movida pela superfície para registrar o perfil da superfície, o que é simples, mas este método tradicional tem o risco de afetar a leitura ou mesmo alterar a amostra como consequência do contato (GANSS *et al.,* 2009b). No entanto, apesar desta limitação, este método apresentou uma correlação muito forte quando comparado com um perfilômetro sem contato e um microscópio confocal de varredura a laser com as mesmas conclusões tiradas separadamente dos dados gerados em cada instrumento (PAEPEGAEYA *et al.,* 2013). Neste estudo, houve uma diferença significativa entre o gel do grupo PA de outros grupos mostrando menos desgaste dentinário em comparação com os outros. Os achados deste estudo permitem entender que também houve uma redução na degradação de MOD por perfilometria. Além disso, foi encontrada uma correlação positiva, significativa e moderada (0,55) entre os resultados da perfilometria com os da análise química (ICTP ELISA).

Outra alternativa para avaliar o desgaste dentinário e a degradação da MOD é por meio da atividade colagenolítica, medindo o conteúdo de hidroxiprolina na saliva artificial após incubação com colagenase (BOTEON *et al.*, 2017). No entanto, este procedimento está sujeito à subjetividade do pesquisador, não permitindo uma descrição sobre a espessura da matriz remanescente e a reprodutibilidade do método torna-se limitada (SCHLUETER *et al.*, 2012).

Neste estudo, foi realizada uma análise de regressão linear simples em que a variável preditora foi o MOD degradada avaliada através da perfilometria e a variável dependente foi a degradação do colágeno avaliada quimicamente pelo método ICTP ELISA. O coeficiente de determinação mostrou que 30,6% dos resultados encontrados

no ICTP ELISA podem ser justificados pelos valores da MOD degradada. O coeficiente beta da regressão evidenciou que a cada micrômetro desgastado da MOD degradada há um aumento significativo de 0,000793 nos valores do ICTP ELISA. Além disso, o teste de correlação de Pearson mostrou que houve uma correlação positiva, moderada (0,55) e significativa entre a perfilometria e o método ICTP ELISA ($p < 0,002$), em que a MOD degradada pôde se considerada um preditor significativo para explicar os valores obtidos através do ICTP ELISA.

7 CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo mostraram que a proantocianidina 10% proporcionou menor desgaste dentário e diminuiu a degradação da matriz orgânica desmineralizada, sugerindo uma maior capacidade para prevenir a erosão dentária.

Além disso, este estudo também sugere que a perfilometria por contato é uma boa estratégia como teste mecânico para quantificar o desgaste dentinário devido à maior acessibilidade e baixo custo quando comparada com o método ICTP ELISA.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ABRAHAMSEN, T. C. The worn dentition: pathognomonic patterns of abrasion and erosion. **Int Dent J**, v. 55, n. 4, Suppl 1, p. 268-76, 2005.

ADDY, M. Tooth brushing, tooth wear and dentine hypersensitivity—are they associated. **Int Dent J**, v. 55, n. 4, Suppl 1, p. 261-7, 2005.

AL-ZAREA, B. K. Tooth surface loss and associated risk factors in northern Saudi Arabia**. SRN Dent**, 2012;2012:161565**,** 2012.

ALI, D. A.; BROWN, R. S.; RODRIGUEZ, L. O.; MOODY, E.L.; NASR, M.F. I. Dental erosion caused by silent gastroesophageal reflux disease. **J Am Dent Assoc**, v. 133, n. 6, p. 734-7, Jun. 2002.

AW, T. C.; LEPE, X.; JOHNSON, G. H.; MANCL L. Characteristics of noncarious cervical lesions: A clinical investigation. **J Am Dent Assoc**, v. 133, n. 6, p. 725-33, Jun. 2002.

ATTIN, T.; BUCHALLA, W.; PUTZ, B. In vitro evaluation of different remineralization periods in improving the resistance of previously eroded bovine dentine against tooth-brushing abrasion. **Arch Oral Biol,** v. 46, n. 9, p. 871-874. 2001.

ATTIN, T.; KNOFEL, S.; BUCHALLA, W.; TÜTÜNCÜ, R. In situ evaluation of different remineralization periods to decrease brushing abrasion of demineralized enamel. **Caries Res,** v. 35, n. 3, p. 216-222, May-Jun. 2001b.

ATTIN, T.; SIEGEL, S.; BUCHALLA, W.; LENNON, A. M.; HANNIG, C.; BECKER, K. Brushing abrasion of softened and remineralised dentin: an in situ study. **Caries Res,** v.38, n.1, p. 62-66, Jan-Feb. 2004.

ATTIN, T.; BECKER, K.; ROOS, M.; ATTIN, R.; PAQUE, F. Impact of storage conditions on profilometry of eroded dental hard tissue. **Clin Oral Investig,** v.13, n. 4, p. 473-478, Dec. 2009.

ATTIN, T.; WEGEHAUPT, F. Methods for assessment of dental erosion. **Monogr Oral Sci,** v. 25, p. 123-142, 2014.

BARTLETT, D. W.; EVANS, D. F.; ANGGIANSAH, A.; SMITH, B. G. The role of the esophagus in dental erosion. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 89, n. 3, p. 312-5, Mar. 2000.

BARTLETT, D. W. The role of erosion intooth wear: aetiology, prevention and management. **Int Dent J**, v. 55, n. 4 Suppl 1, p. 277-84, 2005.

BARTLETT, D. Intrinsic causes of erosion. **Monogr Oral Sci**, v. 20, p. 119-39, 2006.

BARTLETT, D. A new look at erosive toothwear in elderly people. **J Am Dent Assoc**, v. 139, n. 3, p. 252-3, Mar. 2008.

BEDRAN-RUSSO, A. K.; PASHLEY, D.H.; AGEE, K.; DRUMMOND, J. L.; MIESCKE, K. J. Changes in stiffness of demineralized dentin following application of collagen crosslinkers. **J Biomed Mater Res, B Appl Biomater,** v. 86, p. 330-334, 2008.

BEDRAN-RUSSO, A. K.; PAULI, G. F.; CHEN, S. N.; MCALPINE, J.; CASTELLAN, C. S.; PHANSALKAR, R. S.; AGUIAR, T. R.; VIDAL, C. M. P.; NAPOLITANO, J. G.; NAM, J.; LEME, A. A. Dentin biomodification: strategies, renewable resources and clinical applications. **Dent Mater**. v, 30, p. 62-76, 2014.

BONIFAIT, L.; GRENIER, D. Cranberry polyphenols: potencial benefits for dental caries and periodontal disease. **J Can Dent Assoc,** v. 76, p. 130, 2010.

BOTEON, A. P.; KATO, M. T.; BUZALAF, M. A. R.; PRAKKI, A.; WANG, L.; RIOS, D.; HONÓRIO, H. M. Effect of Proanthocyanidin-enriched extracts on the inhibition of wear and degradation of dentin demineralized organic matrix. **Arch Oral Biol,** v. 84, p. 118-124, Dec. 2017.

BRANCO, C. A.; VALDIVIA, A. D. C. M.; SOARES, P. B. F.; FONSECA, R. B.; FERNANDES NETO, A. J.; SOARES, C. J. Erosão dental: diagnóstico e opções de tratamento. **Resv Odontol UNESP**, v. 37, n. 3, p. 235-242, 2008.

BUZALAF, M. A.; HANNAS, A. R.; MAGALHÃES, A. C.; RIOS, D.; HONÓRIO H. M.; DELBEM, A. C. pH cycling models for in vitro evaluation of the efficacy of fluoridated dentifrices for caries control: strengths and limitations. J Appl Oral Sci, **v.** 18**, n.** 4**, p.** 316-34**,** Jul-Aug**.** 2010**.**

BUZALAF, M. A. R.; MAGALHÃES, A. C.; WIEGAND, A. Alternatives to fluoride in prevention and treatment of dental erosion. **Monogr Oral Sci,** v. 25, p. 244-252, 2014.

CARRILHO, M. R.; GERALDELI, S.; TAY, F.; DE GOES, M. F.; CARVALHO, R. M.; TJADERHANE, L.; REIS, A. F.; HEBLING, J.; MAZZONI, A.; BRESCHI, L.; PASHLEY, D. In vivo preservation of the hybrid layer by chlorhexidine. **J Dent Res**, v. 86, n. 6, p. 529-533, 2007.

CARVALHO, T. S. Erosive tooth wear in children**. Monogr Oral Sci**, v. 25, p. 262-78, 2014.

CASTELLAN, C. S.; PEREIRA, P. N.; GRANDE, R. H.; BEDRAN-RUSSO, A. K. Mechanical characterization of proanthocyanidin-dentin matrix interaction. **Dent Mater,** v. 26, p. 968-973. 2010.

CASTELLAN, C. S.; BEDRAN-RUSSO, A. K.; KAROL, S.; PEREIRA, P. N. Long-term stability of dentin matrix following treatment with various natural collagen cross-linkers. **J Mech Behav Biomed Mater,** v. 4, n. 7, p. 1343-1350, Oct. 2011

CASTELLAN, C. S.; BEDRAN-RUSSO, A. K.; ANTUNES, A.; PEREIRA, P. N. Effect of dentin biomodification using naturally derived collagen cross-linkers: one-year bond strength study. **Int J Dent,** e.918010. 2013. DOI: 10.1155/2013/918010.

DÉZIEL, B. A.; PATEL, K.; NETO, C.; GOTTSCHALL-PASS, K.; HURTA, R. A. Proanthocyanidins from the American Cranberry (Vaccinium macrocarpon) inhibit matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 activity in human prostate cancer cells via alterations in multiple cellular signalling pathways. **J Cell Biochem,** v. 111, n. 3, p.742-754, Oct .2010.

ECCLES J. D. Dental erosion of nonindustrial origin, A clinical survey and classification. **J Prosthet Dent**, v. 42, n. 6, p. 649-653, 1979.

ECCLES J. D. Tooth surface loss from abrasion, attrition and erosion. **Dent Update**, v. 9, n. 7, p. 373-374, Aug. 1982.

EPASINGUE, D. J.; YIU, C. K.; BURROW, M. F.; HIRAISHI, N.; TAY, F. R. The inhibitory effect of proanthocyanidin on soluble and collagen-bound proteases. **J Dent**, v. 41, n. 9, p. 832-839, Sep. 2013.

FEGHALI, K.; FELDMAN, M.; LA, V. D.; SANTOS, J.; GRENIER, D. Cranberry proanthocyanidins: Natural weapons against periodontal diseases. **J Agric Food Chem**, v. 13;60, n. 23, p. 5728-5735, Jun. 2012.

FERREIRA, M. C. **Ação de abrasivos no esmalte humano submetido à erosão: um estudo *in situ/ex vivo*.** (Tese). Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina; 2006.

FERREIRA, F. V.; PIOVESAN, C.; PRATZEL, J. R.; ARDENGHL, T. M. Aspectos clínicos e epidemiológicos da erosão dental na dentição permanente: revisão de literatura. **Int J Dent, Recife,** v. 8, n. 2, p. 87-93, 2009.

GANDARA, B. K.; TRUELOVE, E. L. Diagnosis and management of dental erosion. **J Contemp Dent Pract,** v. 15, p. 16-23, 1999.

GANSS, C.; KLIMEK, J.; GIESE, K. Dental erosion in children and adolescents-a cross-sectional and longitudinal investigation using study models. **Community Dent Oral Epidem**, v.29, n.4, p.264-71, Aug. 2001.

GANSS, C.; KLIMEK, J.; STARK, C. Quantitative analyses of the impact of the organic matrix on the fluoride effect on erosion progression in human dentine using longitudinal microradiography. **Arch Oral Biol**, v. 49, p.931-935, 2004a.

GANSS, C.; LUSSI, A.; SOMMER, N.; KLIMEK, J.; SCHLUETER, N. Efficacy of fluoride compounds and stannous chloride as erosion inhibitors in dentine. **Caries Res,** v. 44, p. 248-252, 2004b.

GANSS, C. Definition of erosion and links to tooth wear. **Monogr Oral Sci**, v. 20 p. 9-16, 2006.

GANSS, C.; HARDT, M.; BLAZEK, D,; KLIMEK, J.; SCHLUETER, N. Effects of toothbrushing force on the mineral content and demineralized organic matrix of eroded dentine. **Eur J Oral Sci,** v. 117, p. 255-260, 2009a.

GANSS, C.; LUSSI, A.; SCHARMANN, I.; WEIGELT, T.; HARDT, M.; KLIMEK, J.; SCHLUETER, N. Comparison of calcium analysis, longitudinal microradiography and profilometry for the quantitative assessment of erosion in dentine. **Caries Res**, v. 43, n. 6, 422-429, 2009b.

GAZZANI, G.; DAGLIA, M.; PAPETTI, A. Food components with anticaries activity. **Curr Opin Biotechnol**, v. 23, n. 2, p. 153-159, Apr. 2012.

GUDMUNDSSON, K.; KRISTLEIFSSON, G.; THEODORS, A.; HOLBROOK, W. P. Tooth erosion, gastroesophageal reflux, and salivary buffer capacity. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 79, n. 2, p. 185-189, Feb., 1995.

HARA, A. T; ANDO, M.; CURY, J. A.; SERRA, M. C; GONZÁLEZ- CABEZAS, C.; ZERO, D.T. Influence of the organic matrix on root dentine erosion by acid citric. **Caries Res**, v.39, p.134-138, 2005.

HARA, A.; LUSSI, A.; ZERO, D. T. Biological Factors. **Monogr Oral Sci,** v. 20, p. 88-99, 2006.

HONÓRIO, H. M.; RIOS, D.; SANTOS, C. F.; MAGALHÃES, A. C.; BUZALAF, M. A.; MACHADO, M. A. Effects of erosive, cariogenic or combined erosive/cariogenic challenges on human enamel: an in situ/ex vivo study. **Caries Res**, v. 42, n. 6, p. 454-459, 2008.

HONÓRIO, H. M.; RIOS, D.; SANTOS, C. F.; MAGALHÃES, A. C.; DELBEM, A. C.; BUZALAF, M. A.; MACHADO, M. A. Cross-sectional microhardness of human enamel subjected to erosive, cariogenic or combined erosive/cariogenic challenges. **Caries Res**, v. 44, n. 1, p. 29-32, 2010.

HUYSMANS, M. C.; CHEW, H. P.; ELLWOOD, R. P. Clinical studies of dental erosion and erosive wear. **Caries Res**, 2011;45 Suppl 1:60-8.

IMFELD T. Dental erosion. Definition, classification and links. **Eur J Oral Sci**, v. 104, n. 2 (Pt 2), 151-155, 1996.

PAEPEGAEYA, A. M.; BARKERB, M. L.; BARTLETTC, D. W.; MISTRYC, M.; WESTD, N. X.; HELLIND, N.; BROWN, L. J.; BELLAMY, P. G. Measuring enamel erosion: a comparative study of contact profilometry, non-contact profilometry and confocal laser scanning microscopy. **Dent Mater**, v. 29, n. 12, p. 1265-1272, 2013.

GARNERO, P.; BOREL, O.; BYRJALSEN, I.; FERRERAS, M.; DRAKE, F. H.; MCQUENEY, M. S.; FOGED, N. T.; DELMAS, P. D.; DELAISSÉ, J. M. The collagenolytic activity of cathepsin K is unique among mammalian proteinases. **J Biol Chem**, v. 27, n. 48, 32347-32352, Nov. 1998.

GEDALIA, I.; DAKUAR, A.; SHAPIRA, L.; LEWINSTEIN, I.; GOULTSCHIN, J.; RAHAMIM, E. Enamel softening with coca-cola and rehardening with milk or saliva. **Am J Dent**, v. 4, p. 120- 122, 1991.

GOH, K. L.; MEAKIN, J. R.; ASPDEN, K. M.; HUSKINS, D. W. Stress transfer in collagen fibrils reinforcing connective tissue: effects of collagen fibril slenderness and relative stiffness. **J Theor Biol**, v.245, p. 305-311, 2007.

GRIPPO, J. O.; SIMRING, M.; SCHREINER, S. Attrition, abrasion, corrosion and abfraction revisited. A new perspective on tooth surface lesions. **J Am Dent Assoc**, v. 135, n. 8, p. 1109-18, Aug. 2004.

GUIMARÃES, A. R. D.; PERES, M. A.; VIEIRA, R. S.; FERREIRA, R. M.; RAMOS-JORGE, M. L.; APOLINARIO, S.; DEBROM, A. Self-perception of side effects by

adolescents in a chlorhexidine fluoride based preventive oral health program. **J Appl Oral Sci**, v. 14, n. 4, p. 291-296, Aug. 2006.

HAN, B.; JAUREQUI, J.; TANG, B. W.; NIMNI, M. E. Proanthocyanidin: a natural crosslinking reagent for stabilizing collagen matrices. **J Biomed Mater Res,** Part A. v. 65, p. 118-124, 2003.

HAGERMAN, A. E.; KLUCHER, K. Tannin-protein interactions. **Clin Biol Res**, v. 213, p. 67-76, 1986.

HAGERMAN, A. E.; BUTLER, L. G. The specificity of proanthocyanidin-protein interactions. **J Biol Chem**, v. 256, p. 4494-4497, 1981.

HEBLING, J.; PASHLEY, D. H.; TJÄDERHANE, L.; TAY, F. R. Chlorhexidine arrests subclinical degradation of dentin hybrid layers in vivo. **J Dent Res,** v. 84, n. 8, p. 741-746, 2005.

KAIDONIS, J. A. Oral diagnosis and treatment planning: part 4. Non-carious tooth surface loss and assessment of risk. **Br Dent J**, v. 213, n. 4, p. 155-161, Aug. 2012.

KATO, M. T.; MARIA, A. G.; VAZ, L. G.; ITALIANI, F. D. E.; SALES-PERES, S. H.; BUZALAF MA. Effect of iron supplementation on the erosive potencial of carbonated or decarbonated beverage. **J Appl Oral Sci**, v. 15, n. 1, p. 61-64, Feb. 2007.

KATO, M.T.; MAGALHÃES, A. C.; RIOS, D.; HANNAS, A. R.; ATTIN, T.; BUZALAF, M. A. R. Protective effect of green tea on dentin erosion and abrasion. **J Appl Oral Sci**, v.17, p.560-564, 2009.

KATO, M. T.; LEITE, A. L.; HANNAS, A. R.; BUZALAF, M. A. Gels containing MMP inhibitors prevent dental erosion in situ. **J Dent Res**, v. 89, p. 468-472. 2010a.

KATO, M. T.; LEITE, A.L.; HANNAS, A. S.; OLIVEIRA, R. C.; PEREIRA, J. C.; TJÄDERHANE, L.; BUZALAF, M. A. R. Effect of iron on matrix metalloproteinase inhibition and on the prevention of dentine erosion. **Caries Res**, v. 44, n. 3, p. 309-316, 2010b.

KATO, M. T.; LEITE, A. L.; HANNAS, A. R.; CALABRIA, M. P.; MAGALHÃES, A. C.; PEREIRA, J. C.; BUZALAF, M. A. R. Impact of protease inhibitors on dentin matrix degradation by collagenase. **J Dent Res**, v. 91, n. 12, p. 1119-1123, Dec. 2012.

KATO, M. T.; BOLANHO, A.; ZARELLA, B. L.; SALO, T.; TJADERHANE, L.; BUZALAF, M. A. Sodium fluoride inhibits MMP-2 and MMP-9. **J Dent Res**, v. 93, p. 74-77, 2014.

KENNEDY, J. A.; TAYLOR, A. W. Analyses of proanthocyanidins by high-performance gel permeation chromatography. **J Cromatogr A**, v. 2, p. 99-107, May. 2003.

KINNEY, J. H.; BALOOCH, M.; HAUPT, D. L.; MARSHALL, S. J.; MARSHALL G. W. Jr. Mineral distribuition and dimensional changes in human dentin during demineralization. **J Dent Res**, v. 74(5), p. 1179-1184, 1995.

KLETER, G. A.; DAMEN, J. J.; EVERTS, V.; NIEHOF, J.; TEN CATE, J. M. The influence of the organic matrix on demineralization of bovine root dentin in vitro. **J Dent Res**, v. 73, n. 9, p. 1523-1539, Sept. 1994.

KLONT, B.; TEN CATE, J.M. Remineralization of bovine incisor root lesions in vitro: the role of the collagenous matrix. **Caries Res**, v. 25, n. 1, p. 39-45, 1991.

LA, V. D.; HOWELL, A. B.; GRENIER, D. Cranberry proanthocyanidins inhibit MMP production and activity. **J Dent Res**, v. 88, n. 7, p. 627-632, Jul. 2009.

LAGERWEIJ, M. D.; BUCHALLA, W.; KOHNKE, S.; BECKER, K.; LENNON, A. M.; ATTIN, A. Prevention of erosion and abrasion by a high fluoride concentration gel applied at high frequencies. **Caries Res**, v.40, n. 2 p.148-53, 2006.

LEVITCH, L. C.; BADER, J. D.; SHUGARS, D. A. Non-carious cervical lesions. **J Den**, v. 22, n. 4, p. 195-207, 1994.

LEWINSTEIN, I.; OFEK, L.; GEDALIA, I. Enamel rehardening by soft cheeses. **Am J Dent**, v. 6, p. 46-48, 1993.

LITONJUA, L. A.; ANDREANA, S.; BUSH, P. J.; COHEN, R. E. Tooth wear: attrition, erosion and abrasion. **Quintessence Int**, v. 34, p. 435-446, 2003.

LUSSI, A.; JAEGGI, T.; ZERO, D. The role of diet in the aetiology of dental erosion. **Caries Res**, v. 38 ,Suppl 1, p. 34-44, 2004.

LUSSI, A. Dental erosion: From diagnosis to therapy. **Communit Dent Oral Epidemiol,** v. 34, p. 398-399, 2006.

LUSSI, A.; JAEGGI, T. Chemical factors. **Monogr Oral Sci**, v. 20, p. 77-87, 2006.

LUSSI, A.; JAEGGI, T. Erosion – diagnosis and risk factors. **Clin Oral Invest**, v. 12, suppl 1, p 5-13, 2008.

LUSSI, A. Dental erosion – novel remineralizing agents in prevention or repair. **Adv Dent Res**, v. 21, p. 13-16, 2009.

LUSSI, A.; GANSS C. Diagnosis of erosive tooth wear. **Monogr Oral Sci**, v. 25, p. 22-31, 2014.

MAGALHÃES, A. C.; RIOS, D.; HONÓRIO, H. M.; PROVENZANO, M. G.; FRACASSO, M. L. C. Erosão dentária em odontopediatria: relato de caso. **Odontologia clínica-cientifica**, Recife, v. 3, p. 247-251, 2008.

MAGALHÃES, A. C.; WIEGAND, A.; RIOS, D.; HONÓRIO, H. M.; BUZALAF, M. A. Insights into preventive measures for dental erosion. **J Appl Oral Sci**, v. 17, n. 2, p. 75-86, Mar-Apr. 2009.

MAHONEY, E. K.; KILPATRICK, N. M. Dental erosion: part 1. Aetiology and prevalence of dental erosion. **N Z Dent J**, v. 99, n. 2, p. 33-41, Jun. 2003.

MAY, J.; WATERHOUSE, P. J.; Dental erosion and soft drinks: a qualitative assessment of knowledge, attitudeand behavior using focus groups of schoolchildren. A preliminary study. **Int J Paediatr Dent**, v. 13, p. 425- 433, 2003.

MEURMAN, J. H.; TOSKALA, J.; NUUTINEN, P.; KLEMETTI, E. Oral and dental manifestations in gastroesophageal reflux disease. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v. 78, n. 5, p. 583-9, Nov. 1994.

MEURMAN, J. H.; TEN CATE, J. M. Pathogenesis and modifying factors of dental erosion. **Eur J Oral Sci**, v. 104, n. 2 (Pt 2), p. 199-206, 1996.

NASSIF, A. C. S.; BEGOSSO, M. P.; CORRÊA, M. S. N. P. Perimólise: erosão química de esmalte dentário. **Ver Ibero-am Odontopeditr Odontol Bebe**, v. 7, n. 36, p. 150-158, 2004.

NUNN, J. H. Prevalence of dental erosion and the implications for oral health. **Eur J Oral Sci**, v. 104, n. 2 (Pt 2), p. 156-161, 1996.

OSORIO, R.; YAMAUTI, M.; OSORIO, E.; RUIZ-REQUENA, M. E.; PASHLEY, D.; TAY F.; TOLEDANO, M. Effect of dentin etching and chlorhexidine application on metalloproteinase-mediated collagen degradation. **Eur J Oral Sci**, v. 119, n. 1, p. 79-85, Feb. 2011.

PASHLEY, D.H.; TAY, F.R.; YIU, C.; HASHIMOTO, M.; BRESCHI, L.; CARVALHO, R.M. Collagen degradation by host-derived enzymes during aging. **J Dent Res**, v.83, p.216-221, 2004.

PETERSON, G. H.; BRATTHALL, D. The caries decline: a review of reviews. Eur **J Oral Sci**, v. 104, n. 4 (pt 02), p. 436-443, 1996.

RIOS, D.; HONÓRIO, H. M.; MAGALHÃES, A. C.; DELBEM, A. C.; MACHADO, M. A.; SILVA, S. M.; BUZALAF, M. A. R. 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**, v. 40, n. 3, p. 218-223, 2006.

RIOS, D.; MAGALHÃES, A. C.; HONÓRIO, H. M.; BUZALAF, M. A.; LAURIS, J. R.; MACHADO, M. A. The prevalence of deciduos tooth wear in six-year-old children and its relationship with potencial explanatory factors. **Oral Health Prev Dent**, v. 5, n. 3, p.167-171, 2007.

RIOS, D.; HONÓRIO, H. M.; MAGALHÃES, A. C.; SILVA, S. M.; DELBEM, A. C.; MACHADO, M. A.;. Scanning electron microscopic study of the in situ effect of salivary stimulation on erosion and abrasion in human and bovine enamel. **Braz Oral Res**, v. 22, n. 2, p. 132-138, Apr-Jun. 2008.

SABINO K.C., GAYER, C.R., VAZ, L.C., SANTOS, L.R., FELZENSZWALB, I., COELHO, M.G.; BUZALAF, M. A. R. In vitro and in vivo toxicological study of the Pterodon pubescens seed oil. **Toxicol Lett**, v.108, p.27–35, 1999.

SCHEFFEL, D. L.; HEBLING, J.; SCHEFFEL, R. H.; AGEE, K.; TURCO, G.; DE SOUZA COSTA, C. A.; PASHLEY, D. Inactivation of matrix-bound matrix metalloproteinases by cross-linking agents in acid-etched dentin. **Oper Dent**, v. 39, n. 2, p. 152-158, Mar-Apr. 2014.

SCHLUETER, N.; GLATZKI, J.; KLIMEK, J.; GANSS, C. Erosive-abrasive tissue loss in dentine under simulated bulimic conditions. **Arch Oral Biol**, v.57, p. 1176-1182, 2012.

SERRA, M. C.; MESSIAS, D. C. F.; TURSSI, C. P. Control of erosive tooth wear: possibilities and rationale. **Braz Oral Res**, v. 23, n. 1, p. 49-55, 2009.

SCHROEDER, P. L., FILLER, S. J., RAMIREZ, B.; LAZARCHIK, D. A.; VAEZI, M. F.; RICHTER, J. E. Dental erosion and acid reflux disease. **Ann Intern Med**, v. 122, n. 11, p. 809-815, Jun. 1995.

SIERPINSKA, T.; ORYWAL, K.; KUG, J.; GOLEBIEWSKA, M.; SZMITKOWSKI, M. Enamel mineral content in patients with severe tooth wear. **Int J PRosthodont**, v. 26, n. 5, p. 423-428, Sep-Oct. 2013.

SILVERSTONE, L.M.; HICKS, M.J. The structure and ultrastructure of the carious lesion in human dentin. **Gerodontics**, v.1, p.185-193, 1985.

TRAEBERT, J.; MOREIRA, E. A. M. Behavioral eating disorders and their effects on oral health in adolescence. **Pesqui Odontol Bras,** v. 15, n. 4, p. 359-363, 2001.

SOBRAL, M. A. P.; LUZ, M. A. A. C.; GAMA-TEIXEIRA, A.; GARONE NETTO, N. Influência da dieta líquida ácida no desenvolvimento de erosão dental. **Pesqui Odontol Bras**, v. 14, n. 4, p. 406-410, 2000.

STROBEL, S.; HELLWIG, E. The effects of matrix-metallo- proteinases and chlorhexidine on the adhesive bond. **Swiss Dent J**, v. 125, n. 2, p. 134-145, 2015.

TEZVERGIL-MUTLUAY, A.; MUTLUAY, M.; SESEOGULLARI-DIRIHAN, R.; AGEE, K. A.; KEY, W. O.; SCHEFFEL, D. L. S.; BRESCHI, L.; MAZZONI, A.; TJÄDERHANE, L.; NISHITANI, Y.; TAY, F. R.; PASHLEY, D. H. Effect of Phosphoric Acid on the Degradation of Human Dentin Matrix. **J Dent Res***,* v.92, p.87-91, 2013.

TJÄDERHANE, L.; LARJAVA, H.; SORSA, T.; UITTO, V.J.; LARMAS, M.; SALO, T. The activation and function of host matrix metalloproteinases in dentin matrix breakdown in caries lesions. **J Dent Res**, v.47, p. 1622-1629, 1998.

TRUIN, G. J.; VAN RIJKOM, H. M.; MULDER, J.; VAN´T HOF, M. A. Caries trend 1996-2002 among 6 and 12 year-old children and erosive wear prevalence among 12-year-old children in the Hague. **Caries Res**, v. 39, p. 2-8, 2005.

VASCONCELOS, F.M.N.; VIEIRA, S.C.M.; COLARES, V. Dental Erosion: Diagnosis, Prevention and Management under Oral Health. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 14, n. 1, p. 59-64, 2010.

XIE, Q.; BEDRAN-RUSSO, A. K.; WU, C. D. In vitro remineralization effects of grape seed extract on artificial root caries. **J Denti**, v. 36, p. 900-906, 2008.

ZERO, D. T. Etiology of dental erosion--extrinsic factors, **Eur J Oral Sci**, v. 104, n. 2(Pt2), p. 162-177, 1996.

YE, X.; KROHN, R.L.; LIU, W.; JOSHI, S.S.; KUSZYNSKI, C.A.; McGINN, T.R.; BAGCHI, M.; PREUSS, H. G.; STOHS, S. J.; BAGCHI, D. The cytotoxic effects of a

novel IH636 grape seed proanthocyanidin extract on cultured human cancer cells. **Mol Cell Biochem**, v. 196, p. 99–108, 1999.

WEST, N. X.; JOINER, A. Enamel mineral loss. **J Dent**, v.42, Suppl 1:S, p. 2-11, Jun. 2014.

WIEGAND, A.; KOWING, L.; ATTIN, T. Impact of brushing force on abrasion of acid-softened and sound enamel. **Arch Oral Biol**, v. 52, p. 1043-1047, 2007.

APÊNDICE

Effect of 10% Proanthocyanidin gel on demineralized organic matrix degradation: ELISA method

This study evaluated Proanthocyanidin protective effect on dentin subjected to erosion and its inhibition on degradation of the demineralized organic matrix (DOM). The tested groups were: G1 - 10% Proanthocyanidin gel (test group), G2 - 1.23% NaF (positive control 1), G3 - 0,012% Chlorhexidine (positive control 2) and G4 – Placebo (negative control with no active compound) and two methodologies were performed: contact profilometry and ICTP ELISA method. To quantify dentin wear, profilometry was performed. Data were submitted to Analysis of Variance followed by Fisher's LSD Test. To assess the collagen degradation, ICTP ELISA method was performed. Data were submitted to the Kruskal-Wallis followed by the Dunn´s test. Simple linear regression and Pearson Correlation test were also performed ($p<0.05$). The profilometry showed significantly lower wear of G1 when compared to other groups and G2, G3 and G4, which did not present significant difference among them. In the ICTP ELISA analysis, G1 and G4 did not show significant differences and the same happened between G2 and G3. However, G1 and G4 had lower values of collagen degradation compared to groups G2 and G3. Data showed that degraded DOM is a significant predictor to explain the values obtained through the ICTP ELISA.

The results allow to verify that 10% proanthocyanidin provided less tooth wear and decreased degradation of the DOM, suggesting a good ability to prevent dentin erosion. It also suggests that contact profilometry is a good strategy to quantify dentin wear.

Keywords: Dentin. Erosion. Proanthocyanidin. Dentin wear.

INTRODUCTION

Dentin is composed by 47% inorganic components (apatite), 33% organic components and 20% water. Among the organic components, 90% consists of type I collagen and 10% non-collagenous components: dentin phosphoproteins, proteoglycans and glycosaminaglycans.[1, 2, 3] The dentin demineralization rate decreases when the amount of degradable collagen increases, thus, the maintenance of this collagen hinders the diffusion of acids to the tissue, minimizing erosion.[4,5] However, the organic matrix can be chemically degraded due to the presence in dentin enzymes called matrix metalloproteinases (MMPs), which can be activated by a drop in pH below 4.5. [6] However, degradation of the dentin organic matrix is only possible after neutralization of saliva pH, since, although these enzymes are activated at acidic pH, they do not have the capacity to degrade the dentin matrix at the same pH.[6]

In addition to dentin demineralization, the drop in pH exposes collagen fibrils and activates MMPs that degrade the demineralized organic matrix (DOM). This process causes the progressive loss of dentinal tissue. Thus, the use of MMP inhibitors could reduce this mechanism during subsequent erosion challenges, as the organic matrix would function as a protective layer, reducing erosion progression.[4,5] Several studies have proven this mechanism of inhibition, showing a reduction in the progression of erosion when chlorhexidine,[7] green tea[8] and other substances[9] were used as MMP inhibitory agents.

Currently, proanthocyanidin (PA) has drawn the attention of researchers as an alternative MMP inhibitor agent. It is a natural compound derived from fruits, vegetables, nuts, among others,[10,11] which has lower toxicity when compared to synthetic products.[12,13] Studies have shown that PA has a great affinity with proline-rich proteins, such as collagen, in addition to being responsible for increasing the

capacity of cells to synthesize collagen.[10] Other studies have characterized the behavior of PA on dentin, showing its effects on the resin-dentin bonding interface. In these cases, there was a significant improvement in adhesion and mechanical properties, making adhesive restorations more resistant and more long-lasting.[14, 15, 16]

A recent *in situ* study demonstrated that PA can play an important role in preventing erosion after evaluating the effect t of a mouthwash on dentin submitted to erosion.[17] The mouthwash provided significantly lower wear values compared to placebo and the control group. It has also been verified that PA was able to inactivate more than 89% of the total active MMPs, in addition to strengthening demineralized dentin enough to minimize the risk of collapse of the collagen fibril network.

To determine collagen degradation, methodologies such as contact profilometry and hydroxyproline analysis have already been tested.[18] This last method was and still is widely used to determine collagen degradation,[9] although its validity is also discussed due to subjectivity.[19] Another alternative to determine collagen degradation is the use of specific ELISA method for enzymes such as MMPs and cysteine cathepsins. The advantage of this indirect approach is that one may assay the total protease activities of the dentin matrix in their natural bound state, and their responses to activators and inhibitors.[20, 21]

Therefore, this study aimed to evaluate the effect of 10% Proanthocyanidin in the form of a topical gel to minimize the wear of dentin submitted to erosion and to inhibit the degradation of the DOM dentin through contact profilometry and the specific ICTP ELISA analysis.

MATERIAL AND METHODS

Methodology 1:

Experimental design

This cross-sectional simple-blind randomized study was approved by the Research and Ethics Committee of the Bauru School of Dentistry, University of São Paulo (Process: 94400218.8.0000.5417).

Human teeth were used in this study and dentin specimens obtained were randomly allocated into 4 groups: G1 - 10% Proanthocyanidin gel (test group), G2 - 1.23% NaF (positive control 1), G3 - 0,012% Chlorhexidine (positive control 2) and G4 – Placebo (negative control with no active compound). Before the treatment, samples were demineralized by immersion in 0.87 M citric acid, pH 2.3 (36 h at 4ºC). Then, the studied gels were applied once over dentin for 1 minute. Next, the samples were immersed in artificial saliva containing collagenase obtained from *Clostridium histolyticum* for 5 days. The response variable was depth of dentin loss measured by means of profilometry.

Blocks Preparation

In total, 40 specimens were prepared from extracted human teeth. Each dentin specimen (4x4x3 mm) was obtained from a single human tooth and was stored in 0.1% thymol solution (pH 7.0) at 4°C. Each sample was obtained by sectioning the crown longitudinally (Figure 1-a) with 2 parallel diamond discs (XLI 2205, Extec Corp., Enfield, CT, USA), that allowed the removal of occlusal enamel, creating a dentin slice. Next, samples were sectioned to obtain dentin blocks (4x4 mm) (Figure 1-b), which were stored in 0.1% thymol solution (pH 7.0) at 4ºC. The surface of the specimens was polished (Figure 1-c) using water-cooled carborundum discs (320, 600 and 1200

grades of Al_2O_3 papers; Buehler, Lake Bluff, IL, USA) and a 1-µm diamond solution (Buehler). Prior to treatment, marks were made on the surfaces of the samples using a scalpel blade for the precise repositioning on the equipment. Subsequently, three baseline surface profiles were obtained from each wet blocks (only the excess of water was carefully removed with filter paper) using a profilometer (MarSurf GD 25, Göttingen, Germany) at certain distances from the edge: 2.0, 1.75, and 1.5µm (Figure 1-d). The marks and external dentin surface were covered with nail varnish (Cosmed *Indústria de Cosméticos e Medicamento*s, S/A, Barueri, São Paulo, Brazil) (Figure 1-e)in order to allow reference surfaces for wear analysis.

Treatment

Dentin specimens were demineralized by immersion in 0.87 M citric acid (Figure 1-f), pH 2.3 (36 h at 4ºC). Next, samples were thoroughly rinsed in deionized water (30 sec). Excess water was removed with absorbent paper. After demineralization the nail varnish was removed (Figure 1-g) and three profilometric analysis was performed again at the same sites as the baseline measurements (2nd measure) (Figure 1-h). In sequence, the nail varnish was applied again (Figure 1-i) and specimens were randomly allocated into 4 groups, according to the treatment gel (n = 10 per group), as follows: G1 - 10% Proanthocyanidin gel (test group), G2 - 1.23% NaF (positive control 1), G3 - 0,012% Chlorhexidine (positive control 2) and G4 – Placebo (negative control with no active compound). The studied gels were applied once over dentin for 1 minute (Figure 1-j).[9,18,22] All gels formulations presented essentially the same composition (hydroxyethylcellulose, propyleneglycol, methylparaben, imidazolidinyl urea, and deionized water, pH 7.0) except for the active compounds.

Specimens were subjected to collagen degradation (Figure 1-k) by the action of collagenase obtained from Clostridium histolyticum (Type VII, Product No. C0773, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) added in artificial saliva (20 mmol/L HEPES, 0.70 mmol/L $CaCl_2$, 0.20 mmol/L $MgCl_2.6H_2O$, 4 mmol/L KH_2PO_4, 30 mmol/L KCl, 0.30 mmol/L NaN_3) at a concentration of 100 U/mL, for 5 days (37ºC).[23]

Profilometric Analysis

The dentin specimens were maintained wet until the analysis to avoid shrinkage of the organic layer. Immediately before the profilometric measurement, only the excess of water was carefully removed with filter paper. After the immersion time, the nail varnish was removed (Figure 1-l) and three profilometric analysis were performed again (Figure 1-m) at the same sites as the baseline measurements (3rd measure). The dentin blocks were precisely repositioned in the wells of the profilometer, enabling baseline profiles to match with the final ones. Then, the dentin loss was quantitatively determined using specific software (MarSurf XCR 20, Göttingen, Germany) by calculating the average depth of the eroded surface relative to the baseline surface profiles. The response variables were the dentin wear (difference between 1st and 3rd measures) and total amount of degradeted DOM (difference between 2nd and 3rd measures) (Figure 2).

Methodology 2:

Evaluation of Endogenous Matrix-Linked Proteases in Demineralized Dentin

Dentin specimens measuring 6 mm x 2 mm x 1 mm (Figure 1B) were sectioned from the middle coronal portion. Specimens were completely demineralized by 0.5 M

EDTA (pH 7.4; Sigma, St. Louis, USA) for 30 days at 4°C (Figure 1C). Every four days, the EDTA solution was changed for a new one. Then the specimens were washed with deionized water at 4°C for 72 h for complete removal of EDTA residues, thus avoiding a possible inhibition of MMPs.

In sequence, the specimens were treated according to the treatment gel (n = 10 per group). The studied gels were applied once over dentin for 1 minute (Figure 1D). [9,18,22]

All the specimens were immersed in 0.5 ml of a buffered medium composed of 5 mM HEPES, 2.5 mM $CaCl_2.H_2O$, 0.05 mM $ZnCl_2$ and 120 mM NaCl adjusted to pH 7.4 (Figure 1E). The sealed tubes were incubated in a shaking water bath at 37°C for 3 days. All 0.5 ml of medium was removed after 3 days. Aliquots of 10 to 20 µL of the incubation medium were used to measure ICTP collagen fragments.

Matrix degradation by MMPs was determined by measuring the amount of solubilized collagen type I C-terminal telopeptides (ICTP)[21,24] reconnected over the 3-day incubation periods using the ICTP ELISA method (Human Cross-linked Carboxy-terminal telopeptide of type I collagen, Southern California, San Diego - USA) (Figure 1F). The only source of ICTP telopeptide fragments in mineralized zones is attributed to the telopeptidase activity of MMPs. [21,24]

Statistical Analysis

Quantitative data were analyzed by Normality (Shapiro-Wilk test) and variances homogeneity (Levene test). In case they met those assumptions, the data would be compared by a parametric test (ANOVA followed by Fisher's test) and if they did not meet at least one of these assumptions, the test to be used would be the Kruskal-Wallis Test followed by Dunn's test (non-parametric).

Analysis of dentin wear and analysis of the thickness of the demineralized organic matrix (DOM) data were submitted to Analysis of Variance followed by Fisher's LSD test ($p<0.05$).

For the Evaluation of Matrix-Linked Endogenous Proteases in Demineralized Dentin, there was no normal distribution of data and these were submitted to the Kruskal-Wallis Test followed by Dunn's Test ($p<0.05$).

Simple linear regression and Pearson Correlation test were performed to evaluate if the degraded DOM is a good predictor to collagen degradation evaluated by the ICTP ELISA.

Statistical analysis was performed with SigmaPlot 12.0 (Systat Software Inc. San Jose, CA, USA).

RESULTS

The results of dentin wear and DOM degradation are shown in table 1. The data showed that there was no significant difference in dentin wear between groups G2, G3 and G4. However, they showed greater dentin wear when compared to G1.

In the analysis of DOM degradation evaluated by ICTP ELISA, the data showed that there was no significant difference between groups G2 and G4, which had lower values of collagen degradation, showing a statistically significant difference when compared to groups G2 and G3 which did not show significant differences between themselves.

Simple linear regression analysis was performed in which the predictor variable was the degraded DOM evaluated profilometrically and the dependent variable was the collagen degradation evaluated by the ICTP ELISA. For that, the

regression equation was: Endogenous Matrix-Linked Proteases in Demineralized Dentin = 0.0497 + 0.000793 x degraded DOM.

Graph 1 represents the scatter plot showing that there is a positive, significant and moderate correlation (0.55) where the degraded DOM is a significant predictor to explain the values obtained through the ICTP ELISA.

DISCUSSION

Several studies have demonstrated effective inhibitory feats of various agents on MMPs.[9,25,26,27] In this context, chlorhexidine and fluoride have shown the ability to inhibit collagen degradation and inhibit MMPs[7, 22, 25] and that is the reason why they were used as a positive control. On the other hand, chlorhexidine has unwanted side effects such as tooth staining, loss of taste and mucosal ulcer.[28] Therefore, it may not be a good strategy to be used in the long term.

Natural products, such as PA, are increasingly intended for the development of products for oral health because, at first, they involve a lower incidence of side effects.[29] The PA purified from grape seed extract was tested because previous studies have demonstrated its protective effect on dentin erosion[17,30] and in this study, the group treated with PA also had the best results. Thus, since a PA does not have the side effects of a chlorhexidine, its use might be more advantageous for dentin erosion prevention.

Some studies have shown that agents with a high concentration of fluoride are more effective in preventing dental erosion.[9,25,31] It has the ability to promote the formation of a metal- rich resistant acid layer or a layer of calcium fluoride that provides temporary protection against erosive challenges.[32] NaF group showed no statistical

difference from placebo group. This finding has already founded[9,18] and could be due to the response variable used in these studies, which is dentin wear instead of a direct chemical analysis of the different gels ability to inhibit collagen degradation.

In this study, the results of proanthocyanidin were better than the other groups. Studies show that proanthocyanidin positively affects the demineralization and/or remineralization processes and its remineralizing mechanism seems to be different from fluoride[33] which might be related to the formation of an insoluble complex that remains stable in acid pH[34] that further binds to the Ca^{2+} ions in saliva, thereby enhancing remineralization.[33] However, in the present study, it is most likely to proanthocyanidin have improved the DOM by its ability to induce cross-links in dentin collagen and reinforce the remaining collagen matrix. [33, 35, 36,]

In the profilometry analysis, chlorhexidine, fluoride and placebo group showed lower results than the PA group, while in the chemical analysis of collagen degradation performed using the ICTP ELISA, the PA group did not show any significant difference with the placebo group. This can be directly related to the chosen demineralizing agent. Citric acid promotes dentin demineralization and, in this case, caused a great loss of tooth structure, which made it difficult to analyze the exact profilometry of the specimens. Furthermore, in the analysis of collagen degradation performed with the ICTP ELISA, there was a large sample loss. These factors may be related to typing errors in the results or due to the long storage time of the teeth before their use. Despite that, it was noted that both the loss of tooth structure and the difficulty in detecting degraded collagen were equivalent in all groups, which allowed us to maintain the comparison between specimens. Another possible reason for the performance of the proanthocyanidin's performance is the concentration used in this present study (10%).

Studies showed good results in concentrations of proanthocyanidin less than 10% and its dose-response effect.[37]

Profilometry alone on eroded dentin does not reflect mineral loss, since there is interference of collagen matrix.[38] Furthermore, contact profilometers use a diamond-tip stylus moved across the surface to record the surface profile, which is simple, but this traditional method has the potential risk of affecting the reading or even damaging the sample as a consequence of the contact. However, despite its limited analysis, this method showed a very strong correlation when compared with a non-contact.[39] Profilometer and a confocal laser scanning microscope with the same conclusions being separately drawn from data generated on each instrument.[40] In this study there were a significant difference between PA group gel from other groups showing less dentin wear compared to the other groups. Our findings allow us to understand that there was also a reduction in DOM degradation by profilometry. In addition, a positive, significant and moderate correlation (0.55) was found between the profilometry results with those of the chemical analysis (ICTP ELISA).

Another alternative to evaluate dentin wear and DOM degradation is through collagenolytic activity by measuring the hydroxyproline content in artificial saliva after incubation with collagenase.[30] However, this procedure is prone to error and no statement can be made about the thickness of remaining matrix and reproducibility of the method is limited.[19]

In this study, a simple linear regression analysis was performed in which the predictor variable was the degraded DOM evaluated profilometrically and the dependent variable was the collagen degradation evaluated by the ICTP ELISA. It shows that this regression model is significant and that degraded DOM is a significant

predictor to explain ICTP ELISA's value. Besides that, the results show us a significant correlation between them (p<0,002). This correlation is a positive, significant and moderate (0.55) where the degraded DOM is a significant predictor to explain the values obtained through the ICTP ELISA. For this reason, these results seem to be more reliable.

CONCLUSION

The results of this study showed that 10% proanthocyanidin provided less tooth wear and decreased degradation of the demineralized organic matrix, suggesting a greater capacity to prevent tooth erosion.

Furthermore, this study also suggests that contact profilometry is a good strategy as a mechanical test to quantify dentin wear due to its greater accessibility and lower cost when compared to the ELISA method for MMPs.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001. The authors would like to gratefully acknowledge and FAPESP (Process 2018/05847-5).

REFERENCES

1. Magalhães AC, Wiegand A, Rios D, Honório HM, Buzalaf MA. Insights into preventive measures for dental erosion. J Appl Oral Sci. 2009 Mar-Apr;17(2):75-86. doi: 10.1590/s1678-77572009000200002.
2. Pashley DH, Tay FR, Yiu C, Hashimoto M, Breschi L, Carvalho RM, et al. Collagen degradation by host-derived enzymes during aging. J Dent Res. 2004;83(3):216-21. doi: 10.1177/154405910408300306.
3. Silverstone LM, Hicks MJ. The structure and ultrastructure of the carious lesion in human dentin. Gerodontics. 1985;1(4):185-93.
4. Klont B, ten Cate, J.M. Remineralization of bovine incisor root lesions in vitro: the role of the collagenous matrix. Caries Res. 1991;25(1):39-45. doi: 10.1159/000261340.
5. Kleter GA, Damen JJ, Everts V, Niehof J, Ten Cate JM. The influence of the organic matrix on demineralization of bovine root dentin in vitro. J Dent Res. 1994 Sep;73(9):1523-9. doi: 10.1177/00220345940730090701.
6. Tjäderhane L, Larjava H, Sorsa T, Uitto VJ, Larmas M, Salo T. The activation and function of host matrix metalloproteinases in dentin matrix breakdown in caries lesions. J Dent Res. 1998 Aug;77(8):1622-9. doi: 10.1177/00220345980770081001.
7. Carrilho MR, Geraldeli S, Tay F, de Goes MF, Carvalho RM, Tjaderhane L, et al. In vivo preservation of the hybrid layer by chlorhexidine. Journal of dental research. 2007;86(6):529-33. doi: 10.1177/154405910708600608.
8. Kato MT, Magalhães AC, Rios D, Hannas AR, Attin T, Buzalaf MA. Protective effect of green tea on dentin erosion and abrasion. J Appl Oral Sci. 2009 NovDec;17(6):560-4. doi: 10.1590/s1678-77572009000600004.
9. Kato MT, Leite AL, Hannas AR, Buzalaf MA. Gels containing MMP inhibitors prevent dental erosion in situ. J Dent Res. 2010; 89: 468-72. doi: 10.1177/0022034510363248.

10. Han B, Jaurequi J, Tang BW, Nimni ME. Proanthocyanidin: a natural cross-linking reagent for stabilizing collagen matrices. J Biomed Mater Res A. 2003 Apr 1;65(1):118-24. doi: 10.1002/jbm.a.10460.
11. Kennedy JA, Taylor AW. Analyses of proanthocyanidins by high-performance gel permeation chromatography. J Cromatogr A. 2003 May 2;995(1-2):99-107.
12. Sabino KC, Gayer CR, Vaz LC, Santos LR, Felzenszwalb I, Coelho MG. In vitro and in vivo toxicological study of the Pterodon pubescens seed oil. Toxicol Lett. 1999;108(1):27–35. doi: 10.1016/s0378-4274(99)00110-1.
13. Ye X, Krohn RL, Liu W, Joshi SS, Kuszynski CA, McGinn TR, et al. The cytotoxic effects of a novel IH636 grape seed proanthocyanidin extract on cultured human cancer cells. Mol Cell Biochem 1999;196(1-2):99–108.
14. Castellan CS, Pereira PN, Grande RH, Bedran-Russo AK. Mechanical characterization of proanthocyanidin-dentin matrix interation. Dent Mater. 2010 Oct;26(10):968-73. doi: 10.1016/j.dental.2010.06.001.
15. Castellan CS, Bedran-Russo AK, Karol S, Pereira PN. Long-term stability of dentin matrix following treatment with various natural collagen cross-linkers. J Mech Behav Biomed Mater. 2011 Oct;4(7):1343-50. doi: 10.1016/j.jmbbm.2011.05.003.
16. Castellan CS, Bedran-Russo AK, Antunes A, Pereira PN. Effect of dentin biomodification using naturally derived collagen cross-linkers: one-year bond strength study. Int J Dent. 2013; 2013:918010. doi: 10.1155/2013/918010.
17. Cardoso F, Boteon AP, Silva TAPD, Prakki A, Wang L, Honório HM. In situ effect of a proanthocyanidin mouthrinse on dentin subjected to erosion. J Appl Oral Sci. 2020 Oct 23;28: e20200051. doi: 10.1590/1678-7757-2020-0051.
18. Boteon AP, Prakki A, Buzalaf MAR, Rios D, Honório HM. Effect of different concentrations and application times of proanthocyanidin gels on dentin erosion. Am J Dent. 2017 Apr;30(2):96-100.
19. Schulueter N, Glatzki J, Klimek J, Ganss C. Erosive-abrasive tissue loss in dentine under simulated bulimic conditions. Arch Oral Biol. 2012 Sep;57(9):1176-82. doi: 10.1016/j.archoralbio.2012.04.001.
20. Tezvergil-Mutluay A, Mutluay M, Seseogullari-Dirihan R, Agee KA, Key WO, Scheffel DL, et al. Effect of phosphoric acid on the degradation of human dentin matrix. J Dent Res. 2013 Jan;92(1):87-91. doi: 10.1177/0022034512466264.

21. Osorio R, Yamauti M, Osorio E, Ruiz-Requena ME, Pashley D, Tay F, et al. Effect of dentin etching and chlorhexidine application on metalloproteinase-mediated collagen degradation. Eur J Oral Sci. 2011 Feb;119(1):79-85. doi: 10.1111/j.1600-0722.2010.00789.x.
22. Kato MT, Leite AL, Hannas AR, Calabria MP, Magalhães AC, Pereira JC, et al. Impact of protease inhibitors on dentin matrix degradation by collagenase. J Dent Res. 2012 Dec;91(12):1119-23. doi: 10.1177/0022034512455801.
23. Ganss C, Lussi A, Sommer N, Klimek J, Schlueter N. Efficacy of fluoride compounds and stannous chloride as erosion inhibitors in dentine. Caries Research. 2004; 44:248-252. doi: 10.1159/000314671.
24. Garnero P, Borel O, Byrjalsen I, Ferreras M, Drake FH, McQueney MS, et al. The collagenolytic activity of cathepsin K is unique among mammalian proteinases. J Biol Chem. 1998 Nov 27;273(48):32347-52. doi: 10.1074/jbc.273.48.32347.
25. Kato Mt, Bolanho A, Zarella BL, Salo T, Tjaderhane L, Buzalaf MA. Sodium fluoride inhibits MMP-2 and MMP-9. J Dent Res 2014; 93:74-77. doi: 10.1177/0022034513511820.
26. La VD, Howell AB, Grenier D. Cranberry proanthocyanidins inhibit MMP production and activity. J Dent Res. 2009 Jul;88(7):627-32. doi: 10.1177/0022034509339487.
27. Bedran-Russo AK, Castellan CS, Shinohara MS, Hassan L, Antunes A. Characterization of biomodified dentin matrices for potential preventive and reparative therapies. Acta Biomater. 2011 Apr;7(4):1735-41. doi: 10.1016/j.actbio.2010.12.013.
28. Guimarães ARD, Peres MA, Vieira RS, Ferreira RM, et al. Self-perception of side effects by adolescents in a chlorhexidine fluoride based preventive oral health program. J Appl Oral Sci. 2006 Aug;14(4):291-6. doi: 10.1590/s1678-77572006000400015.
29. M. Khaddam M, Salmon B, Le Denmat D, Tjaderhane L, Menashi S, Chaussain C, et al. Grape seed extracts inhibit dentin matrix degradation by MMP-3. Front Physiol. 2014 Oct 31;5:425. doi: 10.3389/fphys.2014.00425.
30. Boteon AP, Kato MT, Buzalaf MAR, Prakki A, Wang L, Rios D, et al. Effect of Proanthocyanidin-enriched extracts on the inhibition of wear and degradation of dentin demineralized organic matrix. Arch Oral Biol. 2017 Dec 84:118-124. doi: 10.1016/j.archoralbio.2017.09.027.

31. Brackett MG, Agee KA, Brackett WW, Key WO, Sabatini C, Kato MT, et al. Effect of Sodium Fluoride on the endogenous MMP Activity of Dentin Matrices. Journal of Natureand Science. 2015;1(6).
32. Lussi A, Jaeggi T, Zero D. The role of diet in the aetiology of dental erosion. Caries Res. 2004;38 Suppl 1:34-44. doi: 10.1159/000074360.
33. Xie Q, Bedran-Russo AK, Wu CD. In vitro remineralization effects of grape seed extract on artificial root caries. J Dent 2008. Nov;36(11):900-6. doi: 10.1016/j.jdent.2008.07.011.
34. Kosasi S, Hart LA, van Dijk H, Labadie RP. Inhibitory activity of Jatropha multifida latex on classical complement pathway activity in human serum mediated by a calcium-binding proanthocyanidin. J Ethnopharmacol. 1989 Nov;27(1-2):81-9. doi: 10.1016/0378-8741(89)90080-9.
35. Bedran-Russo AK, Pauli GF, Chen SN, McAlpine J, Castellan CS, Phansalkar RS, et al. Dentin biomodification: strategies, renewable resources and clinical applications. Dent Mater. 2014 Jan;30(1):62-76. doi: 10.1016/j.dental.2013.10.012.
36. Castellan CS, Bedran-Russo AK, Karol S, Pereira PN. Long-term stability of dentin matrix following treatment with various natural collagen cross-linkers. J Mech Behav Biomed Mater. 2011 Oct;4(7):1343-50. doi:10.1016/j.jmbbm.2011.05.003.
37. Bedran-Russo AK, Pashley DH, Agee K, Drummond JL, Miescke KJ. Changes in stiffness of demineralized dentin following application of collagen crosslinkers. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2008 Aug;86(2):330-4. doi: 10.1002/jbm.b.31022.
38. Ganss C, Hardt M, Blazek D, Klimek J, Schlueter N. Effects of toothbrushing force on the mineral content and demineralized organic matrix of eroded dentine. Eur J Oral Sci. 2009 Jun;117(3):255-60. doi: 10.1111/j.1600-0722.2009.00617.x.
39. Ganss C, Lussi A, Scharmann I, Weigelt T, Hardt M, Klimek J, et al. Comparison of calcium analysis, longitudinal microradiography and profilometry for the quantitative assessment of erosion in dentine. Caries Res. 2009;43(6):422-9. doi: 10.1159/000252975.
40. Paepegaeya AM, Barkerb ML, Bartlettc DW, Mistryc M, Westd NX, Hellind 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. doi: 10.1016/j.dental.2013.09.015.

SUBTITLES

Figure 1- Experimental step flowchart

Figure 2- Illustrative scheme of wear analysis

Table 1 – Mean (±S.D.) of dentin loss (μm) and DOM degradation for the studied groups. Median (interquartile range) of Endogenous Matrix-Linked Proteases in Demineralized Dentin (ICTP ELISA).

*Different lowercase letters indicate statistically significant difference between the groups for the dentin wear and DOM degradation (One Way ANOVA and Fisher's Test). Different upercase letters indicate statistically significant difference between groups for ICTP ELISA (Kruskal-Wallis and Dunn's Test, $p<0.05$).

Graph 1 – Scatter diagram representing positive, significant and moderate to strong correlation.

ANEXOS

USP - FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU DA USP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Efeito de agentes inibidores na degradação da matriz orgânica da dentina desmineralizada
Pesquisador: Fabrícia Cardoso
Área Temática:
Versão: 1
CAAE: 94400218.8.0000.5417
Instituição Proponente: Universidade de Sao Paulo
Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DA NOTIFICAÇÃO

Tipo de Notificação: Envio de Relatório Final
Detalhe:
Justificativa: Envio para os parecerias o relatório final do projeto de pesquisa intitulado "Efeito de
Data do Envio: 11/10/2021
Situação da Notificação: Parecer Consubstanciado Emitido

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.085.885

Apresentação da Notificação:
Trata-se de envio do relatório final e Termos de Cessão de dentes.

Objetivo da Notificação:
Apresentação do relatório final

Avaliação dos Riscos e Benefícios:
Riscos: os dentes foram
cedidos por um cirurgião-dentista sem que houvesse a identificação dos participantes.
Benefícios:
Não houve benefícios diretos, o tratamento foi realizado em dentes extraídos. Porém, como
benefícios indiretos, os resultados dessa pesquisa colaboraram com o desenvolvimento do conhecimento quanto às substâncias que diminuem o desgaste (erosão) dentário.

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

18/11/2021 20:32

DR. WILSON CIRILO
CIRURGIÃO BUCO-MAXILO-FACIAL *CROSP 108608*
MEMBRO EFETIVO DO COLÉGIO BRASILEIRO DE CIRURGIA E TRAMATOLOGIA BUCOMAXILOFACIAL

- *TERMO DE CESSÃO DE DENTES* -

Eu, Wilson Antonio Cirilo Filho , cirurgião-dentista, inscrito no CRO SP 108608, com consultório situado na Rua 15 de Novembro 482, bairro centro, cidade Marília, UF - São Paulo (SP), CEP 17500-050, cedo o(s) 70 (setenta) dente(s) permanente(s)/ 0 (zero) dente(s) decíduo(s) para o desenvolvimento da pesquisa **"Efeito de um gel de Proantocianidina na degradação da matriz orgânica desmineralizada: análise perfilométrica e colagenolítica (ELISA)"**, de autoria de *Fabrícia Cardoso*, sob orientação do Prof. Dr. *Heitor Marques Honório,* declarando que este(s) dente(s) foi(ram) extraído(s) por indicação terapêutica, cujos históricos fazem parte dos prontuários dos pacientes de quem se originam, arquivados sob minha responsabilidade. Estou ciente de que o(s) dente(s) será(ão) utilizado(s) para a referida pesquisa a qual deverá ter sido previamente aprovada por um Comitê de Ética em Pesquisa, sendo preservada minha identidade na divulgação do trabalho.

DECLARO, cumprir as exigências contidas na Resolução 466/12.

Marília, 10 de janeiro de 2020.

Dr Wilson Cirilo
Cirurgião Traumatologista
Bucomaxilofacial
CROSP 108608

Rua XV de Novembro 482 CEP 17500-050 Marília SP
Fone (14) 3432-4041 / (14) 98191-4679
e-mail: wilsoncirilo@me.com

ScholarOne Manuscripts™ | Heitor Honório | Instructions & Forms | Help | Log Out

SciELO Brazilian Oral Research

Home | Author | Review

Author Dashboard / Submission Confirmation

Submission Confirmation

Print

Thank you for your submission

Submitted to	Brazilian Oral Research
Manuscript ID	BOR-2021-1018
Title	Effect of 10% Proanthocyanidin gel on demineralized organic matrix degradation: ELISA method
Authors	Cardoso, Fabrícia Dallavilla, Gabriela Boteon, Ana dos Santos, Angelica Prakki, Anuradha Wang, Linda Honório, Heitor
Date Submitted	12-Nov-2021

Author Dashboard

De: **Cristina Leitão** onbehalfof@manuscriptcentral.com
Assunto: Brazilian Oral Research - Account Created in ScholarOne Manuscripts
Data: 12 de novembro de 2021 13:08
Para: fabriciacardoso@usp.br

CL

12-Nov-2021

Dear Miss Cardoso:

A manuscript titled Effect of 10% Proanthocyanidin gel on demineralized organic matrix degradation: ELISA method (BOR-2021-1018) has been submitted by Miss Fabrícia Cardoso to the Brazilian Oral Research.

You are listed as a co-author for this manuscript. The online peer-review system, ScholarOne Manuscripts, automatically creates a user account for you. Your USER ID and PASSWORD for your account is as follows:

Site URL: https://mc04.manuscriptcentral.com/bor-scielo
USER ID: fabriciacardoso@usp.br
PASSWORD: For security reasons your password is not contained in this email. To set your password click the link below.

https://mc04.manuscriptcentral.com/bor-scielo?URL_MASK=135fb94dbc6d4e94b1da753bae8e90c1

You can use the above USER ID and PASSWORD (once set) to log in to the site and check the status of papers you have authored/co-authored. Please log in to https://mc04.manuscriptcentral.com/bor-scielo to update your account information via the edit account tab at the top right.

To create a new ORCID iD record or to link your user account to an existing ORCID iD, simply click this link:
https://mc04.manuscriptcentral.com/bor-scielo?URL_MASK=b699ec9cef9c47518dd3b9ef373f6091

Thank you for your participation.

Sincerely,
Brazilian Oral Research Editorial Office
Log in to Remove This Account - https://mc04.manuscriptcentral.com/bor-scielo?
URL_MASK=cac40d105ac94bfb8ade9cc358a0aed9