

## **Acquired Pellicle engineering for the control of dental erosion: evaluation of the protective potential of statherin**

### **Engenharia de película adquirida para o controle da erosão dentária: avaliação do potencial protetor da estaterina**

#### **RESUMO**

Este trabalho foi dividido em 3 artigos. Na primeira etapa do primeiro estudo, avaliou-se a influência da fosforilação em serina no grau de proteção contra a erosão dentária *in vitro*, conferida por peptídeos derivados da estaterina. 105 blocos de esmalte bovino foram divididos em 6 grupos: 1) StatSS; 2) StatpSS; 3) StatSpS; 4) StatpSpS; 5) Estaterina recombinante humana e 6) Tampão Fosfato. Na segunda etapa do primeiro estudo, avaliou-se a influência da concentração do peptídeo, com melhor resultado na primeira fase, na proteção contra a erosão dentária. 105 blocos de esmalte bovino foram divididos em 6 grupos: 1) CaneCPI-5 0,1 mg/mL, 2) Tampão Fosfato; 2) StatpSpS  $0,94 \times 10^{-5}$  M; 3) StatpSpS at  $1,88 \times 10^{-5}$  M; 4) StatpSpS  $3,76 \times 10^{-5}$  M; 5) StatpSpS  $7,52 \times 10^{-5}$  M. Os tratamentos foram feitos por 2h a 37°C, sob agitação. Saliva estimulada foi coletada de 3 voluntários para formação da película adquirida (PA) (2h) sobre os espécimes. Desafio erosivo foi feito mediante tratamento com HCl 0,01M por 10s a 37°C, sob agitação, 1X/dia por 3 dias. Foi calculada a % de alteração na dureza superficial (%SHC). Na etapa 1, apenas o peptídeo com as serinas 2 e 3 fosforiladas (StatpSpS) reduziu significativamente a %SHC em comparação com o controle negativo. Na etapa 2, apenas o StatpSpS na concentração de  $1,88 \times 10^{-5}$  M reduziu significativamente a %SHC em relação aos controles negativo e positivo, após 3 dias de tratamento. No segundo estudo, os experimentos foram realizados em 4 dias consecutivos. Em cada dia, os voluntários (n=9), após profilaxia, realizaram bochecho com 10 mL do tampão fosfato puro ou contendo StatpSpS  $1,88 \times 10^{-5}$  M. A película adquirida (PA) foi formada sobre o esmalte durante 3 ou 120 min. Na sequência, a película foi removida com papel filtro, embebido em ácido cítrico 3%. As proteínas foram extraídas e submetidas à cromatografia líquida de fase reversa interligada a um espectrômetro de massas (nLC-ESI-MS/MS). Em ambos os períodos avaliados, o tratamento com

StatpSpS alterou profundamente o perfil proteômico da PA, o que impacta na proteção contra a desmineralização. Na terceira etapa, realizada *in situ*, 180 espécimes de esmalte e dentina bovina foram divididos em: Erosão (n=90) e Erosão+Abrasão (n=90). O estudo teve 3 fases cruzadas (n=30/fase), de acordo com o tratamento: Solução contendo StatpSpS  $1,88 \times 10^{-5}$  M; solução comercial com  $\text{SnCl}_2/\text{NaF}/\text{AmF}$  (Elmex Erosion); água deionizada. 15 voluntários utilizaram um aparelho palatino por 5 dias em cada fase, sendo realizado desafio erosivo com ácido clorídrico a 0,01 M, seguido ou não por desafio abrasivo (escova elétrica e slurry de dentifrício, 15 s). A avaliação do desgaste foi feita por perfilometria de contato. Para ambos os substratos, não houve diferença significativa entre as condições, porém houve diferença significativa entre os tratamentos. O menor desgaste foi encontrado para a solução comercial Elmex e para a solução contendo StatpSpS, que não diferiram significativamente entre si, mas ambas apresentaram maior proteção quando comparadas ao controle negativo. O StatpSpS apresenta ótimo potencial para ser inserido em produtos odontológicos, visando à proteção contra a erosão dentária, por meio de procedimentos envolvendo “engenharia de PA”.

Palavras-chave: Estaterina; Erosão dentária; Película adquirida.

## ABSTRACT

### **Acquired Pellicle engineering for the control of dental erosion: evaluation of the protective potential of statherin**

This thesis was divided into 3 manuscripts. In the first stage of the first study, the influence of serine phosphorylation on the degree of protection against dental erosion *in vitro*, provided by peptides statherin-derived from, was evaluated. 105 bovine enamel blocks were divided into 6 groups: 1) StatSS; 2) StatpSS; 3) StatSpS; 4) StatpSpS; 5) Recombinant human statherin and 6) Phosphate Buffer. In the second stage of the first study, different concentrations of the peptide with the best results in the first stage were evaluated, in the protection against dental erosion. 105 bovine enamel blocks were divided into 6 groups: 1) CaneCPI-5 0.1 mg/mL, 2) Phosphate Buffer; 2) StatpSpS  $0.94 \times 10^{-5}$  M; 3) StatpSpS at  $1.88 \times 10^{-5}$  M; 4) StatpSpS  $3.76 \times 10^{-5}$  M; 5) StatpSpS  $7.52 \times 10^{-5}$  M. The treatments were carried out for 2h at 37°C, under agitation. Stimulated saliva was collected from 3 volunteers to form the acquired pellicle (AP) (2h) on the specimens. Erosive challenge was performed by treatment with 0.01M HCl for 10s at 37°C, under agitation, 1X/day for 3 days. The % change in surface hardness (%SHC) was calculated. In step 1, only the peptide with phosphorylated serines 2 and 3 (StatpSpS) significantly reduced the %SHC compared to the negative control. In step 2, only StatpSpS at a concentration of  $1.88 \times 10^{-5}$  M significantly reduced the %SHC in relation to negative and positive controls, after 3 days of treatment. In the second study, the experiments were performed on 4 consecutive days. On each day, the volunteers (n=9), after prophylaxis, rinsed their mouths with 10 mL of phosphate buffer alone or containing  $1.88 \times 10^{-5}$  M StatpSpS. The acquired pellicle (AP) was formed on the enamel for 3 or 120 min. Subsequently, the pellicle was removed with filter paper, soaked in 3% citric acid. Proteins were extracted and subjected to reversed-phase liquid chromatography coupled to a mass spectrometer (nLC-ESI-MS/MS). In both periods evaluated, treatment with StatpSpS profoundly altered the proteomic profile of the AP, which impacts on the protection against demineralization. In the third study, performed *in situ*, 180 specimens of bovine enamel and dentin were divided into: Erosion (n=90) and Erosion+Abrasion (n=90) conditions. The study had 3 crossover phases

(n=30/phase), according to the treatments:  $1.88 \times 10^{-5}$  StatpSpS solution; commercial solution containing  $\text{SnCl}_2/\text{NaF}/\text{AmF}$  (Elmex Erosion); deionized water. 15 volunteers wore a palatal appliance for 5 days in each phase. Erosive challenges were performed 4x/day with 0.01 M HCl for 1 min, followed or not by an abrasive challenge (electric brush and toothpaste slurry, 15 s, 2x/day). Wear evaluation was performed by contact profilometry. For both substrates, there was no significant difference between the conditions, but there was a significant difference among the treatments. The lowest wear was found for the commercial solution Elmex and for the solution containing StatpSpS, which did not differ significantly from each other, but both showed greater protection when compared to the negative control. StatpSpS has great potential to be inserted into dental products, aiming to protect against dental erosion, through procedures involving "AP engineering".

Keywords: Statherin; Erosion; Acquired Pellicle.