

CENTRO UNIVERSITÁRIO SAGRADO CORAÇÃO

LEONARDO BRITO

ENGENHARIA DE PELÍCULA ADQUIRIDA COM CANECPI-5 ADICIONADA A UM
GEL DE QUITOSANA DE APLICAÇÃO TÓPICA CONTRA EROÇÃO DENTINÁRIA:
ESTUDO IN SITU

BAURU

2023

LEONARDO BRITO

ENGENHARIA DE PELÍCULA ADQUIRIDA COM CANECPI-5 ADICIONADA A UM
GEL DE QUITOSANA DE APLICAÇÃO TÓPICA CONTRA EROSÃO
DENTINÁRIA:ESTUDO *IN SITU*

Trabalho de Conclusão de Curso de
Graduação apresentado como parte dos
requisitos para obtenção do título de
bacharel em Odontologia – Centro
Universitário Sagrado Coração

Orientadora: Prof^a Dr^a Carolina Ortigosa
Cunha.

BAURU

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD

B862e	<p>Brito, Leonardo</p> <p>Engenharia de película adquirida com canecpi-5 adicionada a um gel de quitosana de aplicação tópica contra erosão dentinária: Estudo In Situ / Leonardo Brito. -- 2023. 32f. : il.</p> <p>Orientadora: Prof.^a Dra. Carolina Cunha Ortigosa Coorientador: Prof. Dr. Vinícius Taioqui Pelá</p> <p>Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Odontologia) - Centro Universitário Sagrado Coração - UNISAGRADO - Bauru - SP</p> <p>1. CaneCPI-5. 2. Erosão dentinária. 3. Película adquirida. I. Ortigosa, Carolina Cunha. II. Pelá, Vinícius Taioqui. III. Título.</p>
-------	---

LEONARDO BRITO

ENGENHARIA DE PELÍCULA ADQUIRIDA COM CANECPI-5 ADICIONADA A UM
GEL DE QUITOSANA DE APLICAÇÃO TÓPICA CONTRA EROSÃO DENTINÁRIA:
ESTUDO *IN SITU*

Trabalho de Conclusão de Curso de
Graduação apresentado como parte dos
requisitos para obtenção do título de
bacharel em Odontologia - Universidade
do Sagrado Coração.

Aprovado em:

Banca examinadora:

Profª Dra. Carolina Cunha Ortigosa (Orientadora)

Centro Universitário Sagrado Coração

Profª Dr. Otávio Pagin

Centro Universitário Sagrado Coração

Dedico esse trabalho a todos
aqueles que foram como
o bater de asas de uma borboleta
em minha história.

AGRADECIMENTOS

A teoria do caos, uma das leis mais importantes do Universo, presente em tudo que nos cerca, em tudo que somos. Sua principal ideia, em essência, baseia-se em que uma pequena mudança no início de um evento possa trazer consequências catastróficas em tempo indeterminado e mudanças praticamente imprevisíveis. Intrigado com a teoria, o meteorologista Edward Lorenz trouxe a teoria do caos para ser testada cientificamente. Lorenz estava em um programa em seu computador que simulava massas de ar, sua formação e movimentos. Certo dia teclou um dos números que alimentava os cálculos da máquina com algumas casas decimais a menos, Lorenz esperava que a mudança fosse mínima, mas a alteração imperceptível transformou integralmente as massas de ar e seus padrões. Desse “pequeno erro” surgiu uma das maiores hipóteses: O efeito borboleta, onde Edward afirmou “O simples bater de asas de uma borboleta no Brasil poderá acarretar em um tornado no Texas”.

Assim como o bater de asas de uma borboleta acarreta em significativas mudanças, cada interação mundana entre seres vivos tem total capacidade de gerar uma cascata de acontecimentos, que por sua vez, moldam quem o ser humano se torna; as escolhas que faz; os caminhos que toma; a índole que tem; suas vontades, sonhos e aspirações. Cada contato único, tem sim, a capacidade de mudar um destino inteiro.

Meus agradecimentos são a todos aqueles que foram para mim, como o bater de asas da borboleta, o início de quem me tornei hoje, e quem posso me tornar amanhã.

Agradeço a **Deus**, fonte de toda a sabedoria e amor, que me protegeu, incentivou, perdoou, olhou, zelou e iluminou e me guiou durante esta jornada acadêmica. Agradeço também a todas as **manifestações de espiritualidade** que me acompanharam e me inspiraram, seja qual for o nome que lhes deem. Reconheço que sem a presença divina e a fé que me sustentou, eu não teria conseguido superar os desafios e as dificuldades que encontrei pelo caminho.

Dedico este trabalho a Deus e a todos os seres de luz que me auxiliaram na realização desta conquista. Meu agradecimento também é para **São José e Madre Clélia**, obrigado por sempre olharem e intervirem por mim, os tenho como companhia a mais de 10 anos e continuarei em devoção até o fim de minha vida.

Aos meus **professores**, sempre que demonstrava interesse, encantavam-se mais ainda em me ensinar, mas quando apresentei-me desinteressado, se desdobravam para que surgisse paixão naquilo que eles ensinavam. O conhecimento é a maior dádiva existente, única capaz de libertar nossos corpos e mentes.

Na graduação tive a oportunidade de trabalhar com excelentes profissionais, em especial nas clínicas, onde o apelo ao atendimento humanizado sempre foi muito bem empregado e nos laboratórios, tempo destinado as pesquisas que ajudei a elaborar, em especial agradeço ao Professor **Geraldo Marcos Rosa Junior**, a Professora **Marília Afonso Rabelo Buzalaf** e ao **Dr. Vinícius Taioqui Pelá**; Agradeço a todo apoio e suporte, todo ensinamento e conhecimento passado, sou eternamente grato por confiarem em mim desde o primeiro ano da faculdade.

Aos verdadeiros **amigos**, que sempre me impulsionaram e colocaram de pé, riram das minhas piadas sem graça e sentido, mas que quando precisei, secaram minhas lágrimas e muitas vezes lutaram lutas que não eram deles, mas minhas. Vocês me deram força, ânimo, alegria e confiança para enfrentar os desafios e as dificuldades que surgiram ao longo desta jornada.

A **Luize**, meu anjo, nem se eu explicasse para Apolo, Eros e Afrodite... Eles não entenderiam quando falo de ti. Obrigado por me fazer ser cada dia uma pessoa melhor, rir das minhas piadas e me emprestar seu ombro para que chore. Obrigado por ser minha companheira, conselheira, amiga, por ser o pé no chão da nossa relação, obrigado por insistir quando quero desistir de algo, mas entender quando quero começar algo novo. Você é sempre a melhor hora do dia, o melhor hobby do dia, o melhor compromisso do dia, a melhor pessoa em minha vida. Quando digo que te amo de outras vidas, tenho certeza do que falo. Te amo.

A toda minha família, que tiveram papel fundamental em formar quem sou hoje. Obrigado pelo apoio, incentivo, puxão de orelha, mas principalmente, muito amor. Em especial ao meu **padrinho**, que hoje chamo de pai, obrigado pelos conselhos, pelo tempo passado comigo, obrigado por me escutar quando falo sobre meus planos “mirabolantes” e quando vou te mostrar meus investimentos. A minha

mãe, que se dobra e desdobra para me fazer feliz, obrigado por cada abraço, cada oração, cada bronca, cada vez que me mostra onde posso ser melhor, cada carinho, cada vez que me puxa para baixo e me tira do mundo da lua, cada cafuné, cada beliscão, cada comida especial que faz quando estou com vontade, cada exemplo que me dá, seja como profissional ou como ser humano, obrigado por me entender quando nem eu mesmo me entendo, obrigado por lutar para cuidar de mim e sempre me mostrar que a opinião dos outros jamais importa e se alguém disser que você não pode alguma coisa, mostre a ela que pode, obrigado por me ensinar a ser eu mesmo, mãe, e ter orgulho de quem sou sobre todas as coisas. Ao meu **vô**, que sei que de onde está continua olhando por mim, torcendo e vibrando junto, obrigado por todo abraço que me deu, por toda palavra cruzada, toda corrida de cavalo, todo livro lido, todo leite com toddy que me fazia a noite, todo salgado que me levava quando buscava na escola, todo copo d'água que me pegou, obrigado por ter sido meu maior exemplo do que é ser homem que eu poderia ter, obrigado por ter deixado um pouco de ti comigo, obrigado por ter me feito focar no que valia a pena, obrigado por ter me ensinado tudo que sei, e tudo que sou, e principalmente obrigado por ter me deixado com sua percepção da vida, onde não existe lado ruim, apenas a vista mais linda, a cor mais bonita, a pessoa mais legal, a mensagem mais interessante. O olhar para o que realmente importa.

RESUMO

Recentemente, uma nova cistatina (derivada da cana-de-açúcar) demonstrou uma proteção contra a erosão inicial do esmalte (*in vitro*). Em adição, um experimento *in situ* usando esta mesma proteína (adicionada a uma solução) demonstrou proteção contra a erosão e a erosão associada à abrasão para o esmalte e a dentina através do conceito da “Engenharia de película adquirida”. Entretanto, até o momento não existem estudos da incorporação desta proteína adicionada em gel sobre amostras de dentina. Assim, este projeto tem como objetivo avaliar o potencial protetor da modificação da película adquirida com CaneCPI-5, através de um gel contra a erosão e erosão+abrasão dentinária *in situ*. Serão confeccionados 256 espécimes de dentina radicular humana (4 x 4mm). Em seguida, os espécimes serão divididos em dois tipos de procedimento: Erosão (n=128) e Erosão+Abrasão (n=128) e para cada um deles o estudo será conduzido em 4 fases cruzadas e duplo cegas, de acordo com o gel de tratamento: gel experimental CaneCPI-5 na concentração de 1.0 mg/ml (n=30); gel contendo 12300 ppm F (NaF: controle positivo); gel placebo (n=30) e controle negativo, sem tratamento. 16 voluntários utilizarão um aparelho palatino por 5 dias em cada fase. O tratamento será individualmente com uma microbrush por um minuto e desafios erosivos será com ácido cítrico a 0,1%, seguido ou não por desafio abrasivo. A avaliação do desgaste será feita por perfilometria de contato. Os dados serão checados em relação à normalidade e homogeneidade, para seleção do teste estatístico apropriado ($p < 0,05$).

Palavras-chave: CaneCPI-5; Erosão dentinária; Película adquirida.

ABSTRACT

Recently, a new cystatin (derived from sugarcane) demonstrated a protection against initial enamel erosion (*in vitro*). In addition, an *in situ* experiment using the same protein (added in a solution) demonstrated protection against erosion and erosion associated with abrasion for enamel and dentin through the concept of “acquired film engineering”. However, to date, there are no results of the incorporation of this protein added in gel on dentin samples. Thus, this project aims to evaluate the protective potential of acquired pellicle modification with CaneCPI-5, using a gel against dentin erosion *in situ*. 256 specimens of human root dentin (4 x 4mm) will be divided into two types of procedure: Erosion (n = 128) and Erosion+Abrasion (n = 128). For each of them, the study will be conducted in 4 crossed and double blind phases, according to the gel treatment: experimental gel with 1.0 mg/ml CaneCPI-5 (n = 30); gel containing 12300 ppm F (NaF: positive control) and placebo gel (n = 30) and negative control, no treatment. 16 volunteers will use a palatal appliance for 5 days in each phase. The treatment will be individually with a microbrush for one minute and erosive challenges will be with 0.1% citric acid, followed or not by abrasive challenge. The evaluation of wear will be done by contact profilometry. The data will be checked for normality and homogeneity, for selection of the appropriate statistical test (p<0.05).

Keywords: CaneCPI-5; Enamel Wear; Acquired Pellicle.

Sumário

1	INTRODUÇÃO.....	9
2	OBJETIVOS	13
3	METODOLOGIA.....	14
3.1	COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA HUMANO E ANIMAL.....	14
3.2	EXPRESSÃO HETERÓLOGA DA CANECPI-5	14
3.3	OBTENÇÃO DOS DENTES E PREPARO DAS AMOSTRAS DE DENTINA.....	14
3.4	PROCESSO DE POLIMENTO DAS AMOSTRAS.....	15
3.5	PERFILOMETRIA DE CONTATO INICIAL	16
3.6	SELEÇÃO DOS VOLUNTÁRIOS.....	16
3.7	CONFECÇÃO DO APARELHO PALATINO.....	17
4	MATERIAIS E MÉTODOS	18
4.1	FORMULAÇÃO DOS GÉIS E PRODUÇÃO RECOMBINANTE DA CANECPI-5 ...	18
4.2	ORIENTAÇÕES AOS PARTICIPANTES PARA OS PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	18
4.3	PROTOCOLO EXPERIMENTAL IN SITU	19
4.4	MEDIÇÃO DO DESGASTE DA DENTINA POR PERFILOMETRIA.....	21
4.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	21
5	RESULTADOS	22
6	DISCUSSÃO	23
7	CONCLUSÃO.....	26
	REFERÊNCIAS	27

1 INTRODUÇÃO

A erosão dentária é caracterizada pela perda de tecido dentário duro ocasionada por ácidos de origem não bacteriana (SCHLUETER, N; et al, 2020). Os ácidos são provenientes da dieta (extrínsecos) (BARBOUR, M.E. AND A. LUSSI, 2014). ou do conteúdo gástrico do hospedeiro (intrínsecos) (MOAZZEZ, R. AND D. BARTLETT, 2014). Nos últimos 30 anos, devido ao declínio da prevalência de cárie dentária em países desenvolvidos e em desenvolvimento, as lesões erosivas têm ganhado grande evidência e os estudos publicados anualmente sobre este tema têm crescido enormemente. Apesar deste grande destaque, dados epidemiológicos acerca da erosão dentária ainda são poucos, especialmente a nível nacional ou global, sem contar o fato de que os distintos sistemas de registro dificultam a comparação entre os diferentes estudos. Os poucos dados disponíveis revelam um aumento de prevalência, variando de 1 a 79% em dentes decíduos de crianças de 2 a 5 anos, 14% nos dentes permanentes de crianças de 5 a 9 anos, de 7 a 100% em adolescentes de 9 a 20 anos e de 4 a 100% em adultos (18 a 88 anos) (JAEGGI, T. e A. LUSSI, 2014). Uma revisão sistemática recente estimou a prevalência de desgaste dentário erosivo em dentes permanente de crianças e adolescentes em 30,4% (SALAS, M.M.; et al, 2015). Deve ser considerado que o desgaste dentário erosivo é progressivo e, se não forem instauradas medidas preventivas apropriadas em tempo, a prevalência e severidade tendem aumentar com a idade (JAEGGI, T. e A. LUSSI, 2014), podendo levar à perda dentária. Sendo a prevalência de desgaste dentário erosivo elevado e suas sequelas indesejáveis, a prevenção é altamente necessária.

Nos estágios mais avançados no desenvolvimento da lesão, a dentina acaba sendo exposta (LUSSI, A.; et al, 2011). Com a exposição dentinária, a progressão da lesão erosiva sofre uma mudança expressiva, em decorrência da composição do tecido dentinário, já que a presença da matriz orgânica desmineralizada da dentina atua como uma barreira para a difusão iônica (KLETER, G.A; et al, 1994), reduzindo a progressão da erosão. Estudos realizados nos últimos 8 anos têm revelado que a utilização de inibidores de proteases da matriz, para evitar a degradação da matriz orgânica desmineralizada, é capaz de reduzir a progressão da erosão dentinária (MAGALHAES, A.C e BOTEON, A.P; et al, 2009, 2017).

Quando a erosão atinge a dentina, a dissolução inicial do mineral expõe a matriz orgânica (DELECRODE, T.R; et al, 2015), havendo a formação de uma camada de matriz orgânica totalmente desmineralizada na superfície (DOM), seguida por uma zona parcialmente desmineralizada, até que se chega à dentina sadia interna (BUZALAF, M. A., M.T. KATO E A.R. HANNAS, 2012). A DOM é resistente à remoção por forças mecânicas da escovação de até 4 N (GANSS, C; et al, 2009) e, quando preservada, reduz a progressão da erosão (GANSS, C., J. KLIMEK E C. STARCK, 2004) por limitar a difusão iônica (KLETER, G.A; et al, 1994). Entretanto, enzimas proteolíticas como metaloproteinases da matriz (MMPs) e cisteíno-catepsinas (CCs) podem degradar esta matriz orgânica exposta, acelerando a progressão da erosão (DELECRODE, T.R, BUZALAF, M. A e TJÄDERHANE, L; et al, 2015, 2009, 2015). Com isto em mente, nosso grupo sugeriu a utilização de inibidores de proteases, os quais têm mostrado resultados promissores para reduzir a progressão da erosão dentinária. Dentre estes inibidores, tem-se avaliado a utilização do galato de epigalo catequina (EGCG), clorexidina e fluoreto (KATO, M.T, TJÄDERHANE, L e KATO, M.T.; et al, 2010, 2015, 2009).

Devido à etiologia multifatorial do desgaste dentário erosivo, várias possibilidades preventivas e terapêuticas têm sido propostas para o controle destas lesões. Estas estratégias são, em primeira instância, focadas nos fatores etiológicos (MAGALHAES, A.C, LUSSI, A. E E. HELLWIG E BUZALAF, M.A.R; et al, 2008, 2014, 2018). A saliva é um dos mais importantes fatores biológicos envolvidos na erosão, tendo um papel protetor devido às suas diferentes funções (BUZALAF, M.A.R., HARA, A.T; et al, 2012, 2006). Ela dilui os ácidos e promove a sua eliminação da cavidade bucal, através do *clearance*, além de contribuir para a formação da película adquirida (PA) (BUZALAF, M.A.R.; et al, 2012), que é uma camada orgânica, livre de bactérias, que se forma *in vivo* como resultado da adsorção seletiva de proteínas salivares à superfície do esmalte dentário (DAWES, C., G.N. JENKINS e C.H. TONGUE; et al, 1963). Em relação à composição, tem-se relatado que a exposição a ácidos remove a camada globular externa da PA, deixando a camada basal intacta (HANNIG, M. AND A. JOINER, 2006).

A incorporação de proteínas salivares na película adquirida pode afetar sua habilidade em proteger contra a erosão. Pacientes com erosão têm a metade da quantidade de proteínas na PA formada *in situ* quando comparados ao grupo controle,

o que reforça a importância do papel protetor das proteínas presentes na PA (CARPENTER, G; et al, 2014). Entre estas proteínas encontra-se a mucina, que, quando aderida à superfície do esmalte, sozinha ou combinada com outras proteínas, inibe a desmineralização causada por ataque erosivo (CHEAIB, Z. e A. LUSI, 2011). Em um estudo recente do nosso grupo de pesquisa, identificamos proteínas que restaram na película adquirida formada *in situ* sobre a dentina e *in vivo* sobre o esmalte após exposição a ácido cítrico ou ácido láctico, simulando processos erosivos ou cariosos, respectivamente. Foram identificadas proteínas ácido-resistentes, como as mucinas e cistatinas (DELECRODE, T.R; et al, 2015^a, 2015b). Dentre elas, as cistatinas parecem ser bastante promissoras, pois a expressão relativa da cistatina B mostrou-se aumentada na PA do esmalte 20 e 13 vezes após exposição desta película aos ácidos: cítrico e láctico, respectivamente (DELECRODE, T.R; et al, 2015b). Cistatinas são inibidores reversíveis de cisteíno-peptidases, cujo mecanismo de ação é baseado na inibição competitiva, por meio do bloqueio da atividade proteolítica (ABRAHAMSON, M., 1993). Sendo as cistatinas inibidores de cisteíno-peptidases, é de se esperar que possam reduzir a progressão da erosão na dentina (DELECRODE, T.R e TJÄDERHANE, L; et al, 2015^a, 2015). A cistatina B humana, entretanto, tem um custo muito elevado, de forma que, pensando-se na inserção desta proteína em produtos odontológicos para prevenção de cárie e erosão seria totalmente inviável. Desta forma, se torna extremamente interessante desenvolver alternativas com melhor custo-benefício. A primeira cistatina de cana-de-açúcar produzida em sistema de expressão heteróloga foi denominada Canacistatina (CaneCPI-1) (SOARES-COSTA, A; et al, 2002). Esta proteína apresentou atividade inibitória contra cisteíno-peptidases, inclusive catepsinas humanas (OLIVA, M.L; et al, 2004). Além da CaneCPI-1, outras 4 cistatinas de cana-de-açúcar foram produzidas de forma recombinante e estudadas quanto à sua atividade inibitória (GIANOTTI, A; et al, 2006, 2008). A proteína CaneCPI-4 apresentou expressiva atividade inibitória contra catepsinas humanas B e L (GIANOTTI, A; et al, 2008). Recentemente foi identificada e caracterizada uma nova cistatina da cana-de-açúcar: CaneCPI-5 (SANTIAGO, A.C; et al, 2017). Esta proteína mostrou atividades muito semelhantes àsquelas da CaneCPI-4, sendo capaz de inibir eficientemente um grande número de cisteíno-peptidases, incluindo a catepsina B, que se apresenta resistente à inibição por cistatinas. A inibição de catepsina B pode ser importante para a preservação da matriz orgânica desmineralizada da dentina, pois foi observado que a expressão de

catepsina B, bem como a atividade inespecífica de CCs na dentina cariada foi significativamente maior quando comparada a dentina sadia (NASCIMENTO, F.D.; et al, 2011). Em adição, a CaneCPI-5 mostrou-se bem mais solúvel quando produzida em sistema de expressão bacteriano, o que facilita a sua produção e purificação (SANTIAGO, A.C; et al, 2017).

Desta forma, por acumular as características desejáveis mencionadas acima, a CaneCPI-5 será testada no presente projeto, na tentativa de aumentar a resistência a ácidos da PA, bem como de inibir cisteíno-catepsinas dentinárias, retardando a progressão da erosão na dentina. Devido à homologia existente entre cistatinas de plantas e animais (GIANOTTI, A; et al, 2008) e ao baixo custo de produção das cistatinas de plantas, as mesmas podem ser excelentes alternativas para inserção em produtos odontológicos visando à prevenção da cárie e erosão dentária. Um recente estudo demonstrou o mecanismo de ação da CaneCPI-5 (com e sem a formação da PA) sobre amostras de esmalte nativo. Como resultado, foi observado que a proteína derivada da cana-de-açúcar atua melhor sem a formação da PA (PELÁ, V.T.; et al, 2021). Isso pode estar relacionado com a força de ligação da CaneCPI-5 na superfície do esmalte (6 vezes superior em relação ao controle) apresentada por microscopia de força atômica (AFM) (SANTIAGO, A.C; et al, 2017). Em adição, utilizando um modelo de erosão inicial *in vitro*, demonstramos que o tratamento com CaneCPI-5 na concentração de 1.0 mg/mL sobre amostras de dentina humana (antes da aplicação da saliva: Engenharia de película adquirida) protegeu contra a erosão inicial, não havendo proteção adicional com a utilização de concentrações maiores (dados não publicados).

Além disso, um estudo (*in situ*) recentemente finalizado demonstrou que a CaneCPI-5 através da Engenharia de película adquirida (adicionada à uma solução) protegeu significativamente e erosão em esmalte bovino e em dentina humana quando comparado ao grupo controle (água deionizada). Este efeito foi observado para os dois procedimentos: erosão e erosão + abrasão. Em adição, o grupo experimental (CaneCPI-5) não diferiu significativamente com o grupo controle positivo (Elmex Erosion Protection®) em ambos procedimentos (Dados não publicados).

Estes resultados deixam claro o grande potencial da CaneCPI-5 em prevenir a erosão dentinária, principalmente quando relacionamos o termo Engenharia de

película adquirida (CARVALHO, T.S; et al, 2020). Trata-se ainda de uma proteína de baixo custo de produção e alta estabilidade térmica, o que a torna ideal para inclusão em produtos odontológicos. Em abril de 2017 foi depositado junto ao INPI (BR 10 2017 008691 7) um pedido de patente intitulado “Cistatinas recombinantes da cana-de-açúcar (CaneCPI-5) e sua aplicação para a diminuição da erosão dentária”, tendo como titulares a Universidade Federal de São Carlos, a Universidade de São Paulo e a Universidade de Cambridge. Em abril de 2018 foi feita a extensão deste pedido de patente para o PCT (PCT/BR2018/050134), devido ao interesse já demonstrado por algumas empresas multinacionais da área de produtos odontológicos no potencial de produtos contendo CaneCPI-5. Entretanto, antes que novos produtos sejam desenvolvidos para inserção no mercado são necessários mais estudos, testando a CaneCPI-5 em amostras de dentina com outros veículos de aplicação, como géis de aplicação tópica em um modelo que seja mais próximo da realidade clínica (*in situ*).

Portanto, neste pedido de bolsa podemos observar que a “engenharia de película adquirida”, tem sido sugerida como uma medida promissora para prevenção da erosão dentinária. Além disso, é de extrema importância avaliar a aplicação da CaneCPI-5 (adicionada em gel) em amostras de dentina humana *in situ*.

2 OBJETIVOS

O objetivo deste estudo é avaliar a capacidade protetora da modificação da PA da dentina através de uma proteína derivada da cana-de-açúcar (CaneCPI-5) adicionada em gel contra a erosão e a erosão associada a abrasão dentinária *in situ*.

A hipótese nula a ser testada é:

A modificação da PA da dentina com CaneCPI-5 (através de um gel) não protege contra a erosão e a erosão associada a abrasão dentinária *in situ*.

3 METODOLOGIA

3.1 COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA HUMANO E ANIMAL

Este projeto foi aprovado na reunião ordinária do Comitê de Ética em Pesquisa Humano – CEP 86783418.8.0000 da Faculdade de Odontologia de Bauru – Universidade de São Paulo, com base nas normas éticas da instituição. Todos os voluntários aceitaram a participação no estudo após a leitura e a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

3.2 EXPRESSÃO HETERÓLOGA DA CANECPI-5

A cistatina derivada da cana-de-açúcar (CaneCPI-5) foi realizada sob a coordenação do Prof. Flávio Henrique Silva, na UFSCAR. Assim, a expressão heteróloga da proteína foi desenvolvida através da cepa bacteriana *E. coli* Rosetta (DE3), transformada com o plasmídeo pET28aCaneCPI-5, como descrito previamente (SANTIAGO et al. 2017). Em seguida, a proteína expressa foi purificada da fração solúvel de culturas bacterianas induzidas por IPTG (Isopropil-beta-D-Thiogalactosídeo) através da centrifugação e sonicação. A purificação foi realizada por cromatografia de afinidade, utilizando colunas contendo resina de níquel Ni-NTA Superflow (Qiagen), conforme descrito previamente (SOARES-COSTAS; et al. 2002; SANTIAGO; et al. 2017).

3.3 OBTENÇÃO DOS DENTES E PREPARO DAS AMOSTRAS DE DENTINA

Foram utilizadas 256 amostras de dentina radicular humana de terceiros molares hígidos recém-extraídos (menos de 30 dias), armazenados a 4 °C em NaCl 0,9% suplementado com azida sódica 0,02% (TEZVERGIL-MUTLUAY; et al. 2010). Os dentes foram obtidos pela clínica de cirurgia da Faculdade de Odontologia de Bauru (FOB-USP). Em seguida, os dentes foram selecionados através de uma inspeção visual, a fim de garantir que não apresentassem manchas ou trincas, situação na qual os dentes foram excluídos da pesquisa.

Na sequência foram removidas as coroas, com o auxílio de um aparelho de corte (Maruto, Tóquio-Japão) e um disco diamantado (Maruto, Tóquio-Japão), sendo feita uma secção na porção cervical dos dentes. A porção radicular foi fixada com godiva (Kerr) em uma placa de acrílico (40 x 40 x 5 mm³). A placa foi parafusada em um aparelho de corte de precisão ISOMET LowSpeedSaw (BuehlerLtd, EUA) e com dois discos diamantados dupla face - XL 12205, "High concentration", 102 x 0,3 x 12,7 mm³ (ExtecCorp., Enfield, CT, EUA/ Ref: 12205) e um espaçador de aço inoxidável (7 cm de diâmetro, 4 mm de espessura e orifício central de 1,3 cm) entre os discos, com velocidade de 300 rpm, refrigerado com água deionizada. Por fim, as amostras de dentina foram padronizadas em 4 x 4 mm.

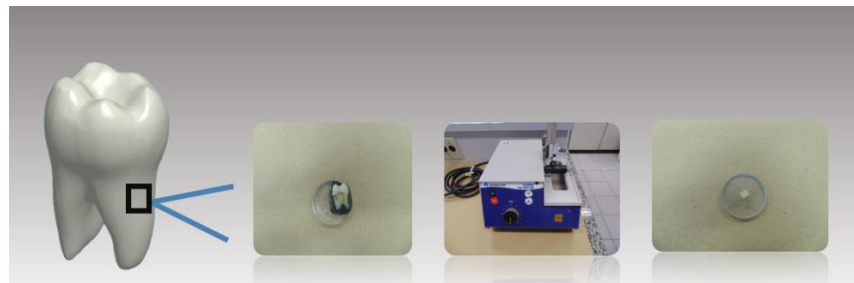


Imagem 1 – Esquema da obtenção dos espécimes padronizados (4 x 4 mm)

3.4 PROCESSO DE POLIMENTO DAS AMOSTRAS

Após o corte, as amostras foram submetidas a um processo de polimento. Para tal, as amostras foram fixadas com cera pegajosa no centro de um disco de acrílico (30 mm de diâmetro por 8 mm de espessura). Também, foi utilizada uma lixa de carbeto de silício de granulação 320, sob refrigeração com água deionizada para padronizar a espessura por aproximadamente 2,5 - 3 mm. Em seguida, a politriz foi acionada em baixa velocidade, até se alcançar a espessura desejada e com a base totalmente plana. Posteriormente, as amostras foram reposicionadas no disco acrílico e novamente o conjunto foi adaptado à politriz. A superfície dentinária externa foi desgastada inicialmente com uma lixa de carbeto de silício de granulação 600, sob refrigeração com água deionizada, durante aproximadamente 2 min (remoção de aproximadamente 150- 200 µm de tecido). Em seguida, foi feito o polimento com lixa de carbeto de silício de granulação 1200 (ExtecCorp.), sob refrigeração, durante 2-4 min, em velocidade alta. Para finalizar o polimento, foi utilizado um feltro (Polishing

cloth, Buheler) umedecido com uma suspensão de diamante de 1 μm (Water based Diamond permanent polishing suspension, Extec Corp.) durante 3 minutos, em velocidade alta. Para impedir a interferência dos grãos/resíduos liberados nos polimentos, as amostras foram lavadas entre cada etapa e no final, utilizando um aparelho de ultrassom T7 Thornton, com frequência de 40 KHz, preenchido com água deionizada, durante 3 minutos. Ao final do polimento, as amostras apresentaram planas e com aspecto vítreo (PELÁ, V.T.; et al. 2021).

3.5 PERFILOMETRIA DE CONTATO INICIAL

Perfis da superfície da dentina foram obtidos com um perfilômetro de contato (MahrPerthometer, Göttingen, Alemanha), antes do período experimental *in situ*. As amostras tiveram uma marcação (pequena cavitação) feita com broca esférica 1/4, para possibilitar o exato posicionamento da ponta do perfilômetro na primeira varredura de cada leitura da perfilometria final. Além disso, a superfície foi marcada (com lâmina de bisturi) para a formação de duas linhas paralelas e a divisão da amostras em três partes.

Em cada leitura, foram realizadas cinco varreduras (comprimento de 3 mm) no centro da superfície da amostra a uma distância de 250 μm cada. Perfis iniciais foram realizados e, posteriormente serão comparados aos perfis finais, utilizando o software MarhSurf XCR20. A média de desgaste para cada amostra será calculada (μm) (os resultados serão apresentados no próximo relatório). As duas partes externas foram protegidas com esmalte cosmético de unha para obtenção das áreas controles, enquanto que a superfície central permaneceu exposta para a realização do protocolo experimental *in situ*. Em seguida, as amostras foram submetidas ao processo de esterilização com óxido de etileno [(30% ETO/70% CO₂) durante 5 horas, sob a pressão de $0.5 \pm 0.1 \text{ kgF/cm}^2$] (de Souza et al. 2018).

3.6 SELEÇÃO DOS VOLUNTÁRIOS

Foram selecionados quinze adultos jovens (homens e mulheres) para a participação neste estudo, na faixa etária entre 20 e 35 anos, residentes em área fluoretada (Bauru-SP, 0,7 ppm F na água de abastecimento), a partir de uma

anamnese, para a avaliação clínica e verificação do fluxo salivar. Os voluntários passaram por um critério de exclusão de saúde geral (gestantes, pacientes com doenças sistêmicas e com uso de medicação) e de saúde bucal (baixo fluxo salivar não estimulado, baixa capacidade tampão, cárie ativas e doença periodontal). Foi considerado o fluxo salivar adequado para saliva estimulada >1.0 mL/min e para saliva não estimulada > 0.3 mL/min (PELÁ, V.T. ; et al. 2021).

A determinação do tamanho da amostra necessária para se obter uma significância clínica entre os grupos de tratamento, considerando uma força amostral de 80% e erro α de 5% foi baseada em estudos *in situ* previamente realizados pelo nosso grupo de pesquisa (DE SOUZA; et al. 2018). Os voluntários só participaram da pesquisa, após explicação minuciosa de seus objetivos a partir de uma leitura da Carta de esclarecimento ao voluntário e da assinatura do TCLE.

3.7 CONFECÇÃO DO APARELHO PALATINO.

Os voluntários tiveram seus arcos superiores moldados com alginato para a confecção do modelo de gesso pedra e do aparelho intrabucal palatino em resina acrílica, no qual foram acopladas aleatoriamente 4 amostras de dentina radicular humana, divididas em 2 fileiras verticais correspondentes ao tipo de lesão (Erosão x Erosão + Abrasão). Todas as amostras foram coladas com cera rentes ao aparelho palatino, para evitar acúmulo de biofilme. Por fim, os aparelhos palatinos foram armazenados 4 °C (com gaze umedecida em água deionizada) até o início da fase experimental *in situ* [4].



Imagem 2 - Aparelho intrabucal palatino

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 FORMULAÇÃO DOS GÉIS E PRODUÇÃO RECOMBINANTE DA CANECPI-5

Para a formulação dos géis, foi adicionada quitosana (desacetilação a 75%, peso molecular médio, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) em solução de ácido acético a 1% (Synth, Diadema, SP, BR). A concentração utilizada foi de 30 mg de quitosana para 1 mL de ácido acético a 1%. Em seguida, foi homogeneizado durante 2 h, a 25°C. Com relação aos géis contendo os ativos (12.300 ppm NaF ou 0,1 mg/mL CaneCPI-5), ambos tratamentos foram incorporados durante a dissolução da quitosana. Neste caso, a mistura também foi homogeneizada por 2 horas a 25 °C. Por fim, o pH de todos os géis foi analisado e permaneceu estável em 5,5 a 5 °C até o início da fase experimental (SANTOS; et al., 2021). Os géis foram preparados na Universidade Federal do ABC, São Paulo, Brasil.

4.2 ORIENTAÇÕES AOS PARTICIPANTES PARA OS PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

Todos os participantes receberam as seguintes orientações: 1) Utilizar exclusivamente o kit fornecido pelos pesquisadores, contendo escova de dente (Oral B®, The Procter & Gamble Company, Cincinnati, OH, EUA), fio dental (Oral B®, The Procter & Gamble Company, Cincinnati, OH, EUA) e creme dental com flúor

(1100ppmF, NaF; Oral B®, The Procter & Gamble Company, Cincinnati, OH, EUA) durante todo o estudo; 2) Retirar o aparelho apenas para beber água (1 min), durante as refeições (20 min) e durante a noite (8 h); 3) Guardar o aparelho envolto em gaze umedecida com água da torneira durante as refeições e durante a noite; 4) Realizar higiene bucal ao acordar e após cada refeição; 5) Realizar a higienização do aparelho palatino, escovando apenas a superfície palatina (lado sem espécimes); 6) Permanecer atento a qualquer descolamento dos espécimes e 7) Realizar o procedimento de abrasão com força padronizada (em torno de 1,5 N), conforme previamente treinado pelos pesquisadores (PELÁ, V.T.; et al., 2021).

4.3 PROTOCOLO EXPERIMENTAL IN SITU

Os 16 participantes foram alocados dentro de 4 fases cruzadas e duplo-cegas. Para cada fase, 4 participantes foram destinados a um dos quatro grupos (determinados por números computadorizados de forma aleatória) da seguinte forma: 1) Sem tratamento (Controle negativo; St); 2) Gel de quitosana (Placebo; Gq); 3) Gel de quitosana contendo 12.300 ppm de NaF (Controle positivo; Gq+NaF) e 4) Gel de quitosana contendo 0,1 mg/mL de CaneCPI-5 (Gq+Cane) (SANTOS; et al., 2021). Durante cada fase, os participantes utilizaram um dos aparelhos palatinos durante 5 dias (de segunda a sexta-feira, das 8 h às 19 h). Para cada fase, um novo aparelho foi utilizado. Entre cada fase, foi estabelecido um intervalo (sem o uso do aparelho) por dez dias.

Durante a fase experimental, os participantes realizaram o seguinte procedimento diário: higienização da cavidade oral (7:55 h). Em seguida, eles aplicaram o gel de tratamento (uma vez/dia às 8:00 h), de acordo com as respectivas fases (exceto para a fase St). Para isso, o gel foi aplicado individualmente com uma *microbrush* (aproximadamente 20 µl por espécime). O gel permaneceu sobre a superfície dos espécimes por 4 min, e após este tempo, o gel foi removido delicadamente com um cotonete. Imediatamente, o aparelho foi colocado na boca para a formação da película adquirida (PA) por duas horas (Figura 1).

Todos os espécimes de dentina foram submetidos a quatro desafios erosivos extra-orais (ERO) por dia (10:00, 14:00, 16:00, 18:00 h). Com isso, os participantes submergiram o aparelho em um copo contendo 150 mL de solução de ácido cítrico a 0,1% (pH 2,5), à temperatura ambiente, por 90 s (sem agitação). Em seguida, eles

enxaguaram os aparelhos com água da torneira por 5 s e os recolocaram na boca. Para cada ERO, uma nova alíquota de ácido cítrico foi usada (PELÁ, V.T.; et al., 2021) (Figura 1).

Para a condição ERO, os espécimes de dentina foram submetidos apenas a erosão (como descrito acima), porém para a condição envolvendo a abrasão (ERO+ABR), os espécimes também foram submetidos ao procedimento abrasivo (somente para espécimes do lado esquerdo do aparelho). Para isso, a abrasão foi realizada pelos participantes duas vezes ao dia, sendo 30 minutos após o primeiro e o último desafio erosivo (às 10:30 e 18:30 h, respectivamente), durante toda a fase experimental. Assim, os participantes escovaram individualmente cada espécime por 15 s, utilizando uma escova de dente elétrica (OralB® Vitality Precision Clean - Electric Toothbrush, Kronberg, HE, DE) e *slurry* (1 g de creme dental 1100ppmF, NaF, Oral B®, The Procter & Gamble Company, Cincinnati, OH, EUA: 3 mL de água deionizada). Em seguida, eles lavaram o aparelho (com água da torneira por 5 s) e os recolocaram na boca (PELÁ, V.T.; et al., 2021) (Figura 1).

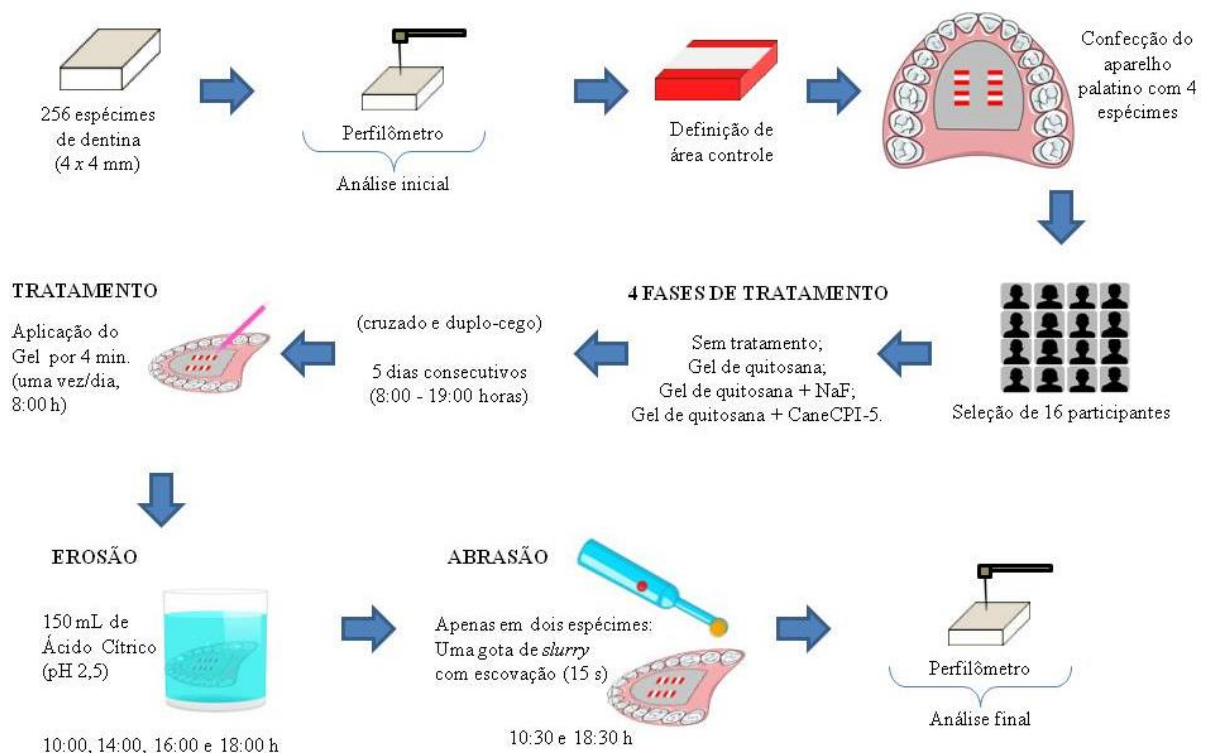


Imagem 3. Esquema metodológico demonstrando os espécimes na análise inicial e final por perfilometria, bem como os procedimentos realizados pelos participantes durante a fase experimental (tratamento com gel, erosão e abrasão).

4.4 MEDIÇÃO DO DESGASTE DA DENTINA POR PERFILOMETRIA

Antes do preparo do aparelho palatino, foram realizados os perfis iniciais dos espécimes de dentina, usando um perfilômetro de contato (Mahr Perthometer, Göttingen, NI, DE). Inicialmente, foi feito um pequeno furo com uma broca $\frac{1}{4}$ (no canto superior e esquerdo de cada espécime). Além disso, foi realizada uma marcação com lâmina de bisturi (dividindo o espécime em três partes), para permitir o exato posicionamento do esmalte cosmético de unha. Estas técnicas serviram como indicador de padronização para a primeira leitura do perfil inicial e final (apresentado no relatório parcial).

Com relação aos parâmetros, foram realizadas cinco leituras em cada espécime (3 mm de comprimento e 250 μm de distância entre elas). Após a análise inicial, a superfície da dentina foi dividida em dois terços para obtenção das áreas de controle. As porções externas (extremidades) foram cobertas com esmalte cosmético de unha (Risque[®], São Paulo, SP, BR), enquanto que a porção central da superfície da dentina permaneceu exposta. Em seguida, todos os espécimes foram submetidos à esterilização com óxido de etileno [(30% ETO/70% CO₂) por 5 h sob pressão de 0,5 \pm 0,1 kgF/cm²] (DE SOUZA; et al., 2018) (apresentado no relatório parcial).

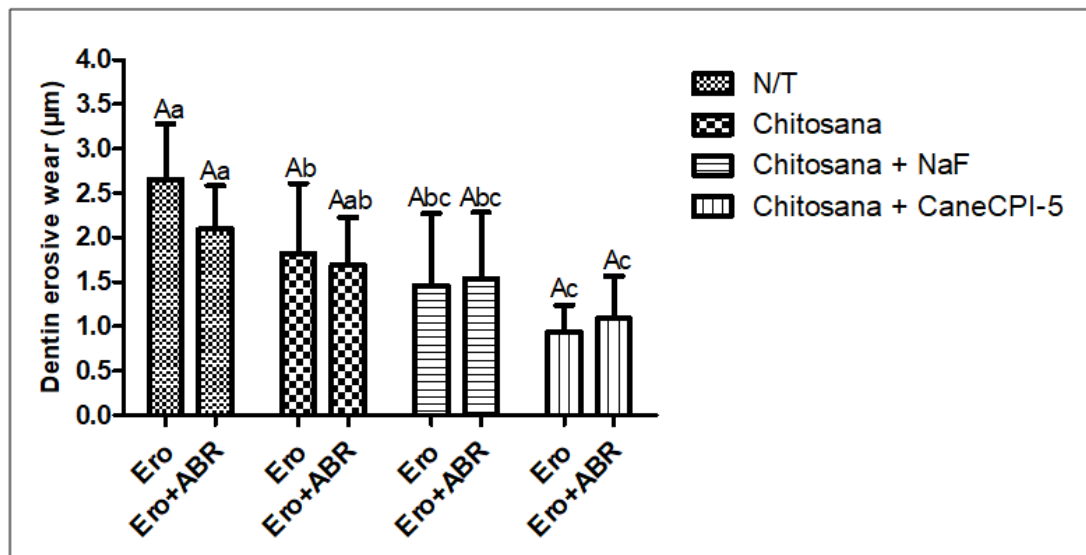
Após o protocolo experimental *in situ*, o esmalte foi cuidadosamente removido (1:1 acetona:água) e o perfil final foi realizado, conforme descrito acima. Para que a leitura final fosse realizada no mesmo local onde foi realizada a leitura inicial, foram necessárias três técnicas: 1) o uso do dispositivo metálico específico para o equipamento, o qual serviu de suporte para fixação dos espécimes; 2) o uso dos eixos x e y da base do perfilômetro para o correto posicionamento de cada espécime e 3) a indicação feita com broca ($\frac{1}{4}$) na superfície dos espécimes para o posicionamento da agulha do perfilômetro. Posteriormente, os gráficos de cada leitura (inicial e perfil final) foram sobrepostos e comparados por meio do software MarhSurf XCR20 (Mahr, Göttingen, NI, DE). Assim, foi medido o desgaste da dentina (μm), considerando o limite mínimo de detecção de 0,5 μm (PELÁ, V.T.; et al., 2021).

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos pelo perfilômetro foram verificados estatisticamente com o software GraphPad Prism (versão 6.0 para Windows, GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, EUA). Para isso, os dados foram verificados com relação à normalidade (teste de Kolmogorov-Smirnov) e a homogeneidade (teste de Bartlett). Posteriormente, os dados foram analisados por ANOVA dois critérios (tratamentos e condições) de medidas repetidas por ambos os fatores, seguido pelo teste de Sidak para comparação individual. O nível de significância foi estabelecido em 0,05.

5 RESULTADOS

Os resultados demonstraram uma diferença significativa entre os tratamentos ($F = 23,15$, $p < 0,0001$), mas não entre as condições ($F = 0,9684$, $p = 0,3274$) ou para a interação entre esses fatores ($F = 1,888$, $p = 0,1363$). Todos os grupos tratados reduziram significativamente a perda de dentina em comparação com o grupo que não foi tratado ($2,65 \pm 0,61$). A maior prevenção da dentina foi encontrada para o grupo tratado com gel de quitosana contendo CaneCPI-5 ($0,93 \pm 0,47$), o qual diferiu significativamente do grupo tratado com gel de quitosana ($1,82 \pm 0,53$), mas não do grupo tratado com gel de quitosana contendo NaF ($1,45 \pm 0,74$). Este último grupo não diferiu significativamente do grupo tratado com gel de quitosana ($p < 0,05$) (Imagem 4).



6 DISCUSSÃO

Esta é a primeira vez que um estudo avalia o gel de quitosana contendo CaneCPI-5 para a prevenção do desgaste erosivo da dentina, sob condições clinicamente relevantes. No presente protocolo *in situ*, houve a presença de todos os participantes durante todo o estudo (ao longo de todas as fases), não havendo queixas sobre o uso do aparelho e os procedimentos realizados por eles, como a aplicação de gel, desafios erosivos e abrasivos. Vale destacar que o aparelho não foi usado durante a noite, pois o fluxo salivar durante esse período é baixo e não se espera que forneça um reendurecimento adicional do esmalte (ALENCAR, et al., 2016). Além disso, optou-se por não utilizar o aparelho durante a noite para garantir o conforto e a qualidade do sono dos participantes.

Um aspecto relevante do nosso protocolo, com implicações do ponto de vista clínico, é que o gel foi aplicado apenas uma vez ao dia (por 4 min, antes da formação da PA). Isso é importante porque no estudo *in situ* anterior, foi utilizado uma solução contendo CaneCPI-5, a qual os participantes aplicaram o líquido nas amostras por 1 min, 4 vezes ao dia, antes de cada desafio erosivo (PELÁ, V.T.; et al., 2021). Pode-se argumentar que isso não é prático, e esse foi um dos motivos pelos quais decidimos testar outro veículo para o uso da CaneCPI-5. Em relação ao tempo de aplicação do gel utilizado neste estudo (4 min), é amplamente empregado na odontologia para

prevenção da cárie dentária, quando são utilizados géis fluoretados (HAWKINSET; et al., 2003).

O presente estudo é um passo para a aplicação clínica do gel de quitosana contendo CaneCPI-5. Em nosso primeiro estudo *in vitro*, espécimes de dentina bovino foram submetidos ao ácido cítrico 0,1% pH 2,5 por 90 s, 4 vezes ao dia, por 7 dias. Os géis de quitosana foram aplicados durante a ciclagem de pH com saliva artificial, 2 vezes ao dia por 4 min, após o primeiro e último desafios erosivos (SANTOS; et al., 2021). No presente estudo *in situ*, os espécimes de dentina humana também foram submetidos a ácido cítrico 0,1% pH 2,5 por 90 segundos, 4 vezes ao dia, seguido ou não de procedimentos abrasivos (2 vezes ao dia), por 5 dias. No entanto, no atual protocolo, os géis de quitosana foram aplicados apenas uma vez/dia por 4 min, antes da formação da PA. A variável de resposta para ambos os estudos foi a perfilometria de contato.

No estudo anterior (*in vitro*) as maiores perdas de dentina foram encontradas para o grupo que permaneceu sem tratamento e placebo, os quais não diferiram significativamente entre si, mas diferiram de todos os outros grupos. O grupo tratado com 0,1 mg/mL de CaneCPI-5 teve perda de dentina significativamente maior quando comparado com os grupos tratados com 0,25 mg/ml de CaneCPI-5 e 1,23%F (não diferiram significativamente entre si). O desgaste da dentina *in vitro* apenas para a condição ERO, envolvendo o grupo que não foi tratado, ou que foram tratados com gel de quitosana, gel de quitosana + NaF ou gel de quitosana + CaneCPI-5 foi de $10,49 \pm 1,48$, $9,26 \pm 2,54$, $1,41 \pm 0,46$ e $3,61 \pm 1,58$ μm , respectivamente (SANTOS et al., 2021). Por outro lado, os valores correspondentes para o presente estudo *in situ* foram $2,65 \pm 0,61$, $1,82 \pm 0,53$, $1,45 \pm 0,74$ e $0,93 \pm 0,47$ μm , respectivamente. Entretanto, no primeiro estudo, a CaneCPI-5 na concentração de 0,25 mg/mL demonstrou melhores resultados ($1,65 \pm 0,70$) do que a CaneCPI-5 na concentração de 0,1 mg/mL. Por outro lado, a CaneCPI-5 na concentração de 0,1 mg/mL demonstrou proteção para o presente estudo. No geral, foi possível observar nesta comparação de protocolos (*in vitro* e *in situ*) que no último estudo houve maior proteção da dentina com concentrações mais baixa da CaneCPI-5 e também houve mais proteção nos demais grupos, principalmente para os grupos que não foram tratados ou tratados com o gel placebo; isso pode ser devido: 1) à presença da PA para proteção contra desgaste erosivo (HANNIG e HANNIG, 2014); 2) a capacidade

tampão da saliva natural contra desafios ácidos (BUZALAF; et al., 2012) e 3) uma quantidade menor (em dias) de desafios erosivos.

Ainda em relação ao resultado da perfilometria (condição ERO), o grupo do controle positivo (Gq+NaF), deve-se destacar que os fluoretos convencionais não são tão eficazes contra a desmineralização erosiva (LUSSI; et al., 2019) em comparação com a eficácia contra a desmineralização cariiosa (TEN CATE e BUZALAF, 2019), uma vez que a camada semelhante ao CaF_2 formada é de curta duração sob a condição mais severa dos desafios erosivos. Até agora, a maior eficácia é vista para a combinação de flúor e estanho (LUSSI; et al., 2019; HUYSMANS; et al., 2014). O efeito preventivo da CaneCPI-5 pode estar relacionado à sua interação com a superfície da dentina. Este processo já foi evidenciado em estudos com o esmalte dentário, alterando assim o perfil proteico da PA (SANTIAGO; et al, 2017; CARVALHO; et al., 2020). Outro aspecto digno de nota é a capacidade preventiva do grupo Qg (sem outros ingredientes ativos além da quitosana) (SANTOS; et al., 2021). Este gel demonstrou proteção significativa para o esmalte e para a dentina quando comparado ao grupo St. Isso pode ser devido à capacidade da quitosana de adsorver a superfície exposta e possivelmente se ligar as proteínas da PA, prevenindo o desgaste erosivo (LEE; et al., 2012; BEKALE; et al., 2015; SANTOS; et al., 2021). Além disso, o efeito protetor na dentina pode ter ocorrido através da inibição das enzimas proteolíticas, tais como metaloproteinases da matriz (MMPs) e cisteíno-catepsinas (CCs), uma vez que a CaneCPI-5 demonstrou inibição de catepsinas humanas B e L. (Gianotti et al., 2008). Futuros estudos serão desenvolvidos para verificar este provável efeito protetor.

Outra novidade do estudo foi avaliar o efeito preventivo dos géis frente aos desafios abrasivos. Esta condição foi realizada através da escovação individual dos espécimes por 15 s, duas vezes ao dia. A avaliação desse tipo de desgaste torna-se importante devido à alta prevalência de escovação inadequada (LITONJUA; et al., 2003) e ao alto grau de abrasividade de determinados dentifrícios, principalmente aqueles com propriedades clareadoras (BORYSENKO e DUDNIKOVA, 2021). Isso se torna ainda mais prejudicial quando a abrasão é seguida por um desafio erosivo (LIPEI; et al., 2017). Entretanto, nossos resultados de perfilometria não demonstraram diferenças entre as condições (ERO vrs. ERO+ABR). A ausência de diferença entre as condições pode ser explicada pelo protocolo de abrasão deste estudo, o qual não foi agressivo o suficiente para demonstrar diferenças entre o desgaste erosivo, ou

seja, a frequência da abrasão foi baixa (apenas duas vezes ao dia), bem como a duração da escovação (15 s cada espécime), quando comparado ao procedimento de desafio erosivo (4 vezes por dia, durante 60 s). Assim, diferentes protocolos devem ser avaliados em estudos futuros.

No geral, vários pontos podem ser destacados do presente estudo: 1) o potencial do gel de quitosana (sem nenhuma incorporação) para proteger contra o desgaste erosivo da dentina; 2) os resultados satisfatórios de um gel de quitosana contendo NaF e, principalmente, CaneCPI-5 para favorecer a redução do desgaste erosivo da dentina; 3) prevenção do desgaste erosivo da dentina pela engenharia de película adquirida com apenas uma aplicação diária de gel (produto para aplicação profissional); 4) a novidade do efeito protetor dos géis sobre a dentina na condição ERO+ABR. Diante do exposto, a hipótese nula inicialmente proposta foi rejeitada.

Perante o sucesso do presente estudo, foi realizado um mesmo protocolo utilizando o gel de aplicação tópica contendo CaneCPI-5, por sua vez realizado com amostras de esmalte bovino, muito semelhante ao esmalte humano quando utilizado em pesquisas. A pesquisa também obteve êxito em seus resultados.

7 CONCLUSÃO

Nossos resultados demonstraram que o gel de quitosana contendo CaneCPI-5 foi capaz de prevenir ERO e ERO+ABR na dentina humana *in situ*. Esses resultados abrem uma nova perspectiva para o desenvolvimento de um produto inovador voltado para a aplicação odontológica profissional, visando à prevenção do desgaste erosivo da dentina.

REFERÊNCIAS

1. Abrahamson, M. (1993). "Cystatins - Protein inhibitors of papain-like cysteine proteinases." *J. Braz Chem Soc* 45(5): 299-304.
2. Alencar CR, Mendonça FL, Guerrini LB, Jordão MC, Oliveira GC, Honório HM, Magalhães AC, Rios D (2016) Effect of different salivary exposure times on the rehardening of acid-softened enamel. *Braz Oral Res* 30:e104
3. Barbour, M.E. e A. Lussi (2014). "Erosion in relation to nutrition and the environment." *Monogr Oral Sci* 25: 143-154.
4. Bekale L, Agudelo D, Tajmir-Riahi HA (2015) Effect of polymer molecular weight on chitosan-protein interaction. *J Colloid Interface Sci* 125:309-317.
5. Borysenko A, Dudnikova M (2021) Clinical rationale of choosing a tooth-bleaching agent. *Georgian Med News* (313):48-51
6. Boteon, A.P., A. Prakki, M.A. Buzalaf, D. Rios e H.M. Honório (2017). "Effect of different concentrations and application time of proanthocyanidin gels on dentin erosion." *American Journal of Dentistry* 30: 96-100.
7. Buzalaf, M. A., M.T. Kato e A.R. Hannas (2012). "The role of matrix metalloproteinases in dental erosion." *Adv Dent Res* 24(2): 72-76.
8. Buzalaf, M.A.R., A.C. Magalhaes e D. Rios (2018). "Prevention of erosive tooth wear: targeting nutritional and patient-related risks factors." *Br Dent J* 224(5): 371-378.
9. Buzalaf, M.A.R., A.R. Hannas e M.T. Kato (2012). "Saliva and dental erosion." *J Appl Oral Sci* 20(5): 493-502.
10. Carpenter, G., E. Cotroneo, R. Moazzez, M. Rojas-Serrano, N. Donaldson, R. Austin, L. Zaidel, D. Bartlett e G. Proctor (2014). "Composition of enamel pellicle from dental erosion patients." *Caries Res* 48(5): 361-367.
11. Carvalho, T.S., T.T. Araújo, T.M.O. Ventura, A. Dionizio, J.V.F. Câmara, S.M. Moraes, V.T. Pelá et al. (2020). "Acquired pellicle protein-based engineering protects against erosive demineralization." *J Dent* 02:103478.
12. Cheaib, Z. e A. Lussi (2011). "Impact of acquired enamel pellicle modification on initial dental erosion." *Caries Res* 45(2): 107-112.
13. Dawes, C., G.N. Jenkins e C.H. Tongue (1963). "The nomenclature of the integuments of the enamel surface of the teeth." *Brit Dent J* 115: 65-68.
14. Delecrode, T.R., W.L. Siqueira, F.C. Zaidan, M.R. Bellini, A.L. Leite, Y. Xiao, D. Rios, A.C. Magalhaes e M.A. Buzalaf (2015). "Exposure to acids changes the proteomic of acquired dentine pellicle." *J Dent* 43(5): 583-588.
15. Delecrode, T.R., W.L. Siqueira, F.C. Zaidan, M.R. Bellini, E. Moffa, M.C. Mussi, Y. Xiao e M.A.R. Buzalaf (2015). "Identification of acid-resistant proteins in acquired enamel pellicle." *J Dent* 43: 1470-1475.
16. de Souza, B. M., L. R. P. Santi, M. de Souza Silva, M. A. R. Buzalaf e A. C. Magalhaes (2018). "Effect of an experimental mouth rinse containing NaF and TiF4 on tooth erosion and abrasion in situ." *J Dent* 73: 45-49.
17. Ganss, C., M. Hardt, D. Blazek, J. Klimek e N. Schlueter (2009). "Effects of toothbrushing force on the mineral content and demineralized organic matrix of eroded dentine." *Eur J Oral Sci* 117(3): 255-260.
18. Ganss, C., J. Klimek e C. Starck (2004). "Quantitative analysis of the impact of the organic matrix on the fluoride effect on erosion progression in

human dentine using longitudinal microradiography." *Arch Oral Biol* 49(11): 931-935.

19. Gianotti, A., C.A. Sommer, A.K. Carmona e F. Henrique-Silva (2008). "Inhibitory effect of the sugarcane cystatin CaneCPI-4 on cathepsins B and L and human breast cancer cell invasion." *Biol Chem* 389(4): 447-453.
20. Gianotti, A., W.M. Rios, A. Soares-Costa, V. Nogaroto, A.K. Carmona, M. L. Oliva, S.S. Andrade e F. Henrique-Silva (2006). "Recombinant expression, purification, and functional analysis of two novel cystatins from sugarcane (*Saccharum officinarum*)." *Protein Expr Purif* 47(2): 483-489.
21. Hannig, M. e A. Joiner (2006). "The structure, function and properties of the acquired pellicle." *Monogr Oral Sci* 19: 29-64.
22. Hannig M, Hannig C (2014) The pellicle and erosion. *Monogr Oral Sci* 25:206-214.
23. Hannig, M. e M. Balz (1999). "Influence of in vivo formed salivary pellicle on enamel erosion." *Caries Res* 33(5): 372-379.
24. Hannig, M. e M. Balz (2001). "Protective properties of salivary pellicles from two different intraoral sites on enamel erosion." *Caries Res* 35(2): 142-148.
25. Hara, A.T., M. Ando, C. Gonzalez-Cabezas, J.A. Cury, M.C. Serra e D.T. Zero (2006). "Protective effect of the dental pellicle against erosive challenges in situ." *J Dent Res* 85(7): 612-616.
26. Hawkins R, Locker D, Noble J, Kay EJ (2003) Prevention. Part 7: professionally applied topical fluorides for caries prevention. *Br Dent J* 195:313-317.
27. Huysmans MC, Young A, Ganss C (2014) The role of fluoride in erosion therapy. *Monogr Oral Sci* 25:230-243.
28. Jaeggi, T. e A. Lussi (2014). "Prevalence, incidence and distribution of erosion." *Monogr Oral Sci* 25: 55-73.
29. Jordão, M.C., C.R. Alencar, I.M. Mesquita, M.A.R. Buzalaf, A.C. Magalhães, M.A. Machado, H.M. Honório, D. Rios (2016). "In situ Effect of Chewing Gum with and without Surface-Active Agents on Initial Enamel Erosive Lesions." *Caries Res* 50(4): 325-333.
30. Kato, M.T., A. Bolanho, B.L. Zarella, T. Salo, L. Tjaderhane e M.A. Buzalaf (2014). "Sodium fluoride inhibits MMP-2 and MMP-9." *J Dent Res* 93(1): 74-77.
31. Kato, M.T., A.C. Magalhaes, D. Rios, A.R. Hannas, T. Attin e M.A. Buzalaf (2009). "Protective effect of green tea on dentin erosion and abrasion." *J Appl Oral Sci* 17(6): 560-564.
32. Kato, M.T., A.L. Leite, A.R. Hannas e M.A. Buzalaf (2010). "Gels containing MMP inhibitors prevent dental erosion in situ." *J Dent Res* 89(5): 468-472.
33. Kleter, G.A., J.J. Damen, V. Everts, J. Niehof e J.M. Ten Cate (1994). "The influence of the organic matrix on demineralization of bovine root dentin in vitro." *J Dent Res* 73(9): 1523-1529.
34. Lee HS, Tsai S, Kuo CC, Bassani AW, Pepe-Mooney B, Miksa D, Masters J, Sullivan R, Composto RJ (2012) Chitosan adsorption on hydroxyapatite and its role in preventing acid erosion. *J Colloid Interface Sci* 385(1): 235-243.

35. Levy, F.M., D. Rios, M.A. Buzalaf, A.C. Magalhães (2014). "Efficacy of TiF₄ and NaF varnish and solution: a randomized in situ study on enamel erosive-abrasive wear." *Clin Oral Investig* 18(4): 1097-1102.
36. Lipei C, Xiangke C, Xiaoyan O (2017) Brushing abrasion of the enamel surface after erosion. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi* 35:379-383
37. Litonjua LA, Andreana S, Bush PJ, Cohen RE (2003) Toothbrushing and gingival recession. *Int Dent J* 53:67-72.
38. Lussi A, Buzalaf MAR, Duangthip D, Anttonen V, Ganss C, Joao-Souza SG, Baumann T, Carvalho TS (2019) The use of fluoride for the prevention of dental erosion and erosive tooth wear in children and adolescents. *Eur Arch Paediatr Dent* 20:517-527.
39. Lussi, A. e E. Hellwig (2014). "Risk assessment and causal preventive measures." *Monogr Oral Sci* 25: 220-229.
40. Lussi, A., N. Schlueter, E. Rakhmatullina e C. Ganss (2011). "Dental erosion—an overview with emphasis on chemical and histopathological aspects." *Caries Res* 45 Suppl 1: 2-12.
41. Lussi A, Schlueter N, Rakhmatullina E, Ganss C (2011) Dental erosion—an overview with emphasis on chemical and histopathological aspects. *Caries Res* 45:2-12.
42. Lussi, A., T. Jaeggi e D. Zero (2004). "The role of diet in the aetiology of dental erosion." *Caries Res* 38 Suppl 1: 34-44.
43. Magalhaes, A.C., A. Wiegand, D. Rios, A. Hannas, T. Attin e M.A. Buzalaf (2009). "Chlorhexidine and green tea extract reduce dentin erosion and abrasion in situ." *J Dent* 37(12): 994-998.
44. Moazzez, R. e D. Bartlett (2014). "Intrinsic causes of erosion." *Monogr Oral Sci* 25: 180-196.
45. Nascimento, F.D., C.L. Minciotti, S. Geraldeli, M.R. Carrilho, D.H. Pashley, F.R. Tay, H.B. Nader, T. Salo, L. Tjaderhane e I.L. Tersariol (2011). "Cysteine cathepsins in human carious dentin." *J Dent Res* 90(4): 506-511.
46. Salas, M.M., G.G. Nascimento, M.C. Huysmans e F.F. Demarco (2015). "Estimated prevalence of erosive tooth wear in permanent teeth of children and adolescents: an epidemiological systematic review and meta-regression analysis." *J Dent* 43(1): 42-50.
47. Santos LA, Martini T, Camara JVF, Reis FN, Ortiz AC, Camiloti GD, Levy FM, Shibao P, Honorio HM, Henrique-Silva F, Pieretti JC, Seabra AB, Cardoso CAB, Buzalaf MAR (2021) Solutions and gels containing a sugarcane-derived cystatin (CaneCPI-5) reduce enamel and dentin erosion in vitro. *Caries Res* 55:594–602
48. Santiago, A.C., Z.N. Khan, M.C. Miguel, C.C. Gironde, A. Soares-Costa, V.T. Pela, A.L. Leite, J.M. Edwardson, M.A.R. Buzalaf e F. Henrique-Silva (2017). "A New Sugarcane Cystatin Strongly Binds to Dental Enamel and Reduces Erosion." *J Dent Res* 96(9): 1051-1057.
49. Schlueter, N., B.T. Amaechi, D. Bartlett, M.A.R. Buzalaf, T.S. Carvalho, C. Ganss, A.T. Hara et al. (2020). "Terminology of Erosive Tooth Wear: Consensus Report of a Workshop Organized by the ORCA and the Cariology Research Group of the IADR." *Caries Res* 54(1): 2-6.
50. Soares-Costa, A., L.M. Beltramini, O.H. Thiemann e F. Henrique-Silva (2002). "A sugarcane cystatin: recombinant expression, purification, and antifungal activity." *Biochem Biophys Res Commun* 296(5): 1194-1199.

51. Ten Cate JM, Buzalaf MAR (2019) Fluoride Mode of Action: Once There Was an Observant Dentist. *J Dent Res* 98:725-730.
52. Tezvergil-Mutluay, A., K.A. Agee, T. Hoshika, M. Carrilho, L. Breschi, L. Tjäderhane, Y. Nishitani, R.M. Carvalho, S. Looney, F.R. Tay, D.H. Pashley (2010). "The requirement of zinc and calcium ions for functional MMP activity in demineralized dentin matrices." *Dent Mater* 26(11):1059-67.
53. Tjäderhane, L., M.A. Buzalaf, M. Carrilho e C. Chaussain (2015). "Matrix Metalloproteinases (MMPs) and other Matrix Proteinases in Relation to Cariology: the Era of "Dentine Degradomics". *Caries Res* 49(3):193-208.
54. Oliva, M.L., A.K. Carmona, S.S. Andrade, S.S. Cotrin, A. Soares-Costa e F. Henrique-Silva (2004). "Inhibitory selectivity of canecystatin: a recombinant cysteine peptidase inhibitor from sugarcane." *Biochem Biophys Res Commun* 320(4): 1082-1086.
55. Pela, V. T., J. G. Q. Lunardelli, C. K. Tokuhara, C. C. Gironda, N. D. G. Silva, T. S. Carvalho, A. C. Santiago, B. M. Souza, S. M. Moraes, F. Henrique-Silva, A. C. Magalhaes, R. C. Oliveira e M. A.R. Buzalaf (2021a). "Safety and In situ Antierosive Effect of CaneCPI-5 on Dental Enamel." *J Dent Res* 100(12): 1344-1350.
56. Pelá, T.P., M.A.R. Buzalaf, S.H. Niemeyer, T. Baumann, F. Henrique-Silva, D. Toyama, E. Crusca, R. Marchetto, A. Lussi e T.S. Carvalho (2021). "Acquired pellicle engineering with proteins/peptides: Mechanism of action on native human enamel surface." *J Dent* 107